

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yaitu pengaruh variasi waktu deasetilasi terhadap karakteristik kitosan dari limbah cangkang siput sawah (*Filopaludina javanica*).

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Universitas Buana Perjuangan Karawang, karakterisasi pengujian FTIR dilakukan di Laboratorium Karakterisasi Lanjut LIPI Cibinong - BRIN, sementara determinasi dilakukan di Museum Zoologi Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cangkang siput sawah, HCl 37 % (pro analis), NaOH (pro analis), asam asetat 2%, aquades, kertas saring whatmann nomor 42, pH universal dan aluminium foil.

3.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mortir dan stemper, ayakan mesh 80, *hotplate stirrer*, *magnetic stirrer*, oven, tanur, timbangan digital, vakum, labu erlenmeyer dan corong buncher, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, pipet ukur, bola hisap, corong, batang pengaduk, spatula, desikator, lemari asam dan basa, cawan porselen, kurs porselen, sarung tangan dan *Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer* (FTIR).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi waktu yang diberikan yaitu 4 jam, 6 jam dan 8 jam.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik kitosan dari cangkang siput sawah; rendemen, kadar air, kadar abu, kelarutan, dan derajat deasetilasi.

3.4.3 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini, yaitu:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1.	Variasi waktu	Kitosan cangkang siput sawah yang diambil dari sampel dengan variasi waktu yang diberikan yaitu 4 jam, 6 jam dan 8 jam.	-	-	1. 4 jam 2. 6 jam 3. 8 jam

Tabel 3.1 Lanjutan

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Terikat					
2.	Rendemen	Rendemen ditentukan berdasarkan persentase berat kitosan yang dihasilkan dari berat kitin yang diperoleh.	Timbangan	Rasio	Persen (%)
3.	Kadar air	Pengujian kadar air dapat dilakukan dengan pemanasan.	Oven desikator	Rasio	Persen (%)
4.	Kadar abu	Pengujian kadar abu menunjukkan banyaknya kandungan mineral yang masih tersisa dalam suatu bahan.	Tanur desikator	Rasio	Persen (%)
5.	Kelarutan	Kelarutan diamati dengan membandingkan kejernihan larutan kitosan dengan kejernihan pelarutnya.	Organoleptik	Nominal	1. Tidak larut 2. Larut

Tabel 3.1 Lanjutan

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
6.	Derajat deasetilasi kitosan	Derajat deasetilasi kitosan ditentukan berdasarkan perbandingan nilai absorbansi pita serapan dari spektrum inframerah pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} dan 3450 cm^{-1} .	FTIR	Rasio	Persen (%)
7.	Analisis FTIR	FTIR (<i>Fourier Transform Infra Red</i>) terjadi dalam spektrum elektromagnetik daerah inframerah pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .	FTIR	Rasio	Persen (%)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Bahan Baku Cangkang Siput Sawah

Bahan baku utama dalam penelitian ini adalah cangkang siput sawah yang didapat dari Desa Tegalsawah, Karawang. Cangkang siput sawah dikeringkan, setelah kering dihaluskan, dan diayak dengan ayakan ukuran 80 mesh untuk mendapatkan ukuran yang seragam. Untuk digunakan sebagai bahan baku pembuatan kitosan dibutuhkan serbuk

cangkang siput sawah yang lolos melewati ayakan sebanyak 200 gram (Ainurrofiq, *et al.*, 2017).

3.5.2 Tahap Sintesis Kitosan

Sintesis kitosan dapat dilakukan dengan tiga tahap, yaitu demineralisasi, deproteinasi, dan deasetilasi. Berikut urutan sintesis kitosan:

1. Demineralisasi

Demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan mineral yang terdapat pada serbuk cangkang siput sawah (Ainurrofiq, *et al.*, 2017). Serbuk cangkang siput sawah dan larutan HCl 1,5 M dicampurkan ke dalam gelas kimia kemudian direndam selama 72 jam, kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 4 jam sambil diaduk menggunakan *hotplate stirrer* pada kecepatan pengadukan 100 rpm (Mursal, *et al.*, 2021).

2. Deproteinasi

Deproteinasi bertujuan untuk menghilangkan kandungan protein pada serbuk cangkang siput sawah (Ainurrofiq, *et al.*, 2017). Serbuk cangkang siput sawah hasil dari tahap demineralisasi ditambahkan larutan NaOH 3,5% antara sampel dan pelarut dengan perbandingan 1:10 (b/v). Campuran dimasukkan ke dalam gelas kimia, kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 4 jam sambil diaduk menggunakan *hotplate stirrer* pada kecepatan pengadukan 100 rpm (Mursal, *et al.*, 2021).

3. Deasetilasi

Deasetilasi bertujuan untuk memutus rantai gugus asetil (-COCH₃) dari kitin dengan menggunakan larutan alkali sehingga fungsi dari gugus asetil digantikan dengan gugus amina (-NH₂) (Ainurrofiq, *et al.*, 2017). Untuk membuat kitosan dari hasil yang diperoleh dari proses deproteinasi (kitin) perlu melalui tahap deasetilasi dengan menambahkan larutan NaOH 60% dengan

perbandingan 1:10 (b/v). Campuran diaduk menggunakan *hotplate stirrer* dengan kecepatan pengadukan 300 rpm, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C, dengan variasi waktu pengadukan yaitu 4 jam, 6 jam, dan 8 jam. Pada setiap tahap setelah pengadukan, berulang kali mencuci residu dengan aquades kemudian menyaringnya sampai pH netral dicapai. Residu yang sudah netral dikeringkan di dalam oven dengan suhu 80°C sampai beratnya konstan (Mursal, *et al.*, 2021).

3.5.3 Karakterisasi Kitosan

1. Rendemen

Rendemen kitosan yang semula kitin dihitung dengan menentukan berdasarkan persentase berat kitosan yang dihasilkan dari berat kitin yang diperoleh (Agustina, *et al.*, 2015). Rendemen dapat dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{berat kitosan kering (gram)}}{\text{berat kitin kering (gram)}} \times 100 \% \dots \dots \dots (3. 1)$$

2. Kadar Air

Kadar air adalah salah satu parameter penting untuk mutu kitosan. Menahan atau meminimalkan kerusakan kitosan, seperti yang disebabkan oleh mikroorganismenya, dapat dicapai dengan menjaga bahan pada kadar air yang rendah (Fadli, *et al.*, 2017). Kitosan harus memenuhi standar kadar air $\leq 10\%$ untuk dianggap berkualitas tinggi. Pengujian kadar air dapat dilakukan dengan cara pemanasan sebagai berikut: Kitosan ditimbang sebanyak 0,5 gram masukkan kedalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya. Kitosan dipanaskan pada suhu 100-105 °C selama 1-2 jam dalam oven. Kemudian didinginkan selama kurang lebih 30 menit dalam desikator dan kemudian ditimbang. Diulangi sampai beratnya konstan (Agustina, *et al.*, 2015). Kadar air dapat dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air \%} = \frac{B1 - B2 \text{ (gram)}}{Bs \text{ (gram)}} \times 100 \% \dots \dots \dots (3. 2)$$

Keterangan:

B1 = Berat cawan + sampel basah (gram)

B2 = Berat cawan + sampel setelah kering (gram)

Bs = Berat sampel

3. Kadar Abu

Kadar abu adalah parameter yang penting untuk menentukan mutu kitosan. Kadar abu yang lebih rendah menunjukkan tingkat kemurnian kitosan yang lebih tinggi karena menunjukkan lebih sedikit kandungan mineral yang dihilangkan selama pemrosesan (Wisuda, *et al.*, 2014). Mempertahankan keadaan pH yang netral melalui pencucian menyeluruh juga mengurangi kadar abu (Zahiruddin, *et al.*, 2008). Kadar abu dalam kitosan adalah <2% untuk memenuhi standar mutu. Kitosan sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam kurs porselen yang telah diketahui berat kosongnya. Selama 60 menit, kitosan dipijarkan sampai suhu 600°C di dalam tanur. Setelah kitosan diabukan dimasukkan kedalam desikator sampai menjadi suhu ruang lalu ditimbang beratnya (Masindi, *et al.*, 2017). Kadar abu dapat dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu \%} = \frac{B2 - B1 (\text{gram})}{Bs (\text{gram})} \times 100 \% \dots \dots \dots (3. 3)$$

Keterangan:

B1 = Berat kurs kosong (gram)

B2 = Berat kurs + sampel setelah diabukan (gram)

Bs = Berat sampel

4. Kelarutan

Kitosan dilarutkan dalam asam asetat konsentrasi 2% dengan perbandingan 1:100 (b/v). Kelarutan kitosan dalam asam asetat merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk menilai kualitas standar mutu kitosan. Semakin tinggi kelarutan kitosan dalam asam asetat 2% berarti akan semakin baik mutunya. Kelarutan diamati

dengan cara melihat kemudian membandingkan kejernihan pelarut dengan larutan kitosan (Agustina, *et al.*, 2015).

5. Derajat Deasetilasi

FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) dapat digunakan untuk menentukan nilai derajat deasetilasi. Sebelum dibuat pelet KBr, kitosan disimpan didalam desikator selama 24 jam. Pelet KBr dibuat dengan mencampurkan serbuk cangkang siput sawah sebanyak 1 gram dan KBr sebanyak 10-100 mg. Campuran serbuk digerus sampai homogen dan ditekan dengan pompa hidrolis. Spektrofotometer FTIR digunakan untuk analisis pelet yang dihasilkan.

Analisa bergantung pada fakta bahwa berbagai jenis molekul bergetar pada frekuensi yang berbeda. Frekuensi ini terjadi dalam spektrum elektromagnetik daerah inframerah pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} . Derajat deasetilasi kitosan ditentukan dengan metode *base-line*. Metode ini berdasarkan perbandingan nilai absorbansi pita serapan dari spektrum inframerah pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} dan 3450 cm^{-1} (Azhar, *et al.*, 2010). Kategori kitosan secara umum adalah di atas 50% dan idealnya 80-100% untuk mendapatkan kadar minimal derajat deasetilasi (Mursal, *et al.*, 2021). Derajat deasetilasi dapat dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$A = \text{Log} \frac{P_0}{P}$$

$$\% \text{ DD} = 1 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right) \times 100 \% \dots \dots \dots (3. 4)$$

Keterangan:

P_0 = Persen transmitten pada garis datar

P = Persen transmitten pada garis minimum

A_{1655} = Absorbansi pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1}

A_{3450} = Absorbansi pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1}

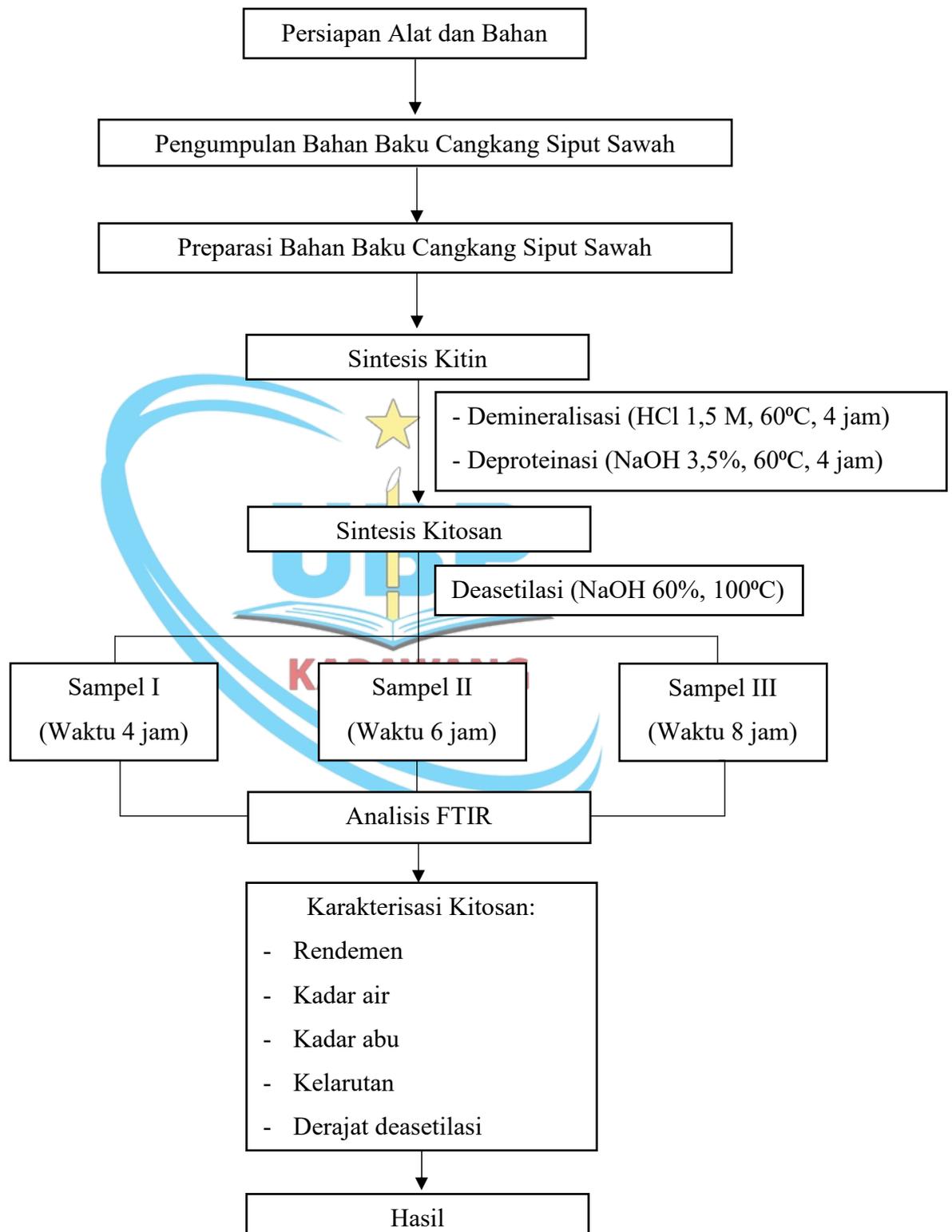
1,33 = Konstanta untuk derajat deasetilasi yang sempurna.

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian diolah menggunakan *Microsoft Excel* dilakukan untuk mengetahui karakteristik kitosan dari cangkang siput sawah yaitu rendemen, kadar air, kadar abu, kelarutan, dan derajat deasetilasi.



3.7 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.5 Diagram Alir Penelitian