

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk kedalam jenis penelitian eksperimental di Laboratorium. Tempat penelitian ini dilakukan di laboratorium Farmasi Ubp Karawang. Rancangan yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan cangkang keong mas (*Pomacea canaliculata*) kemudian dibuat kitosan dari hasil deasetilasi kitin dengan menggunakan variasi waktu 3 jam, 4 jam, dan 5 jam.

3.2 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.2.1 Alat

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah mortir dan stemper, corong, gelas kimia, pipet volume dan pipet filter, gelas ukur, labu ukur, cawan porselen, batang pengaduk, thermometer, spatula, kurs porselen, tang kurs, desikator, *hotplate stirrer*, neraca analitik, lemari asam dan basa, ayakan no. Mesh 80, kertas pH, oven, *furnance*, *fourier Transform Infra-Red Spectrophotomer* (FTIR).

3.2.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah cangkang keong mas, HCl (*Pro Analis*), NaOH (*Pro Analis*), asam asetat glasial, aquadest, kertas saring whattman no 42, aluminium foil.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variasi Bebas

Variabel bebas yang terlibat dalam penelitian ini adalah variasi waktu deasetilasi yang diberikan yaitu 3 jam, 4 jam, dan 5 jam.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis proksimat dari kitosan meliputi kadar abu, kadar air, kelarutan, derajat deasetilasi, *Fourier Transform Infra-Red Spectrophotomer* (FTIR)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Bahan Baku Cangkang Keong Mas

Cangkang keong mas sebagai bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu di peroleh dari pengepul keong mas yang ada di daerah Dusun kompa, Desa Cimahi, Kec.Klari, Kabupaten Karawang. Cangkang keong mas dikumpulkan, selanjutnya dibersihkan dan dicuci menggunakan air mengalir lalu dikeringkan dibawah sinar matahari, setelah cangkang keong mas kering dilakukan proses penghalusan lalu diayak menggunakan ayakan mesh no 80. Proses penghalusan dan pengayakan disini berfungsi untuk memperkecil ukuran partikel, semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaan akan semakin besar sehingga daya serap umumnya akan mengalami peningkatan. Ukuran partikel yang besar umumnya akan menghasilkan luas permukaan yang rendah dan mengakibatkan daya serap menurun. Hal ini dikarenakan pada ukuran partikel yang kecil, terdapat tenaga intramolekul yang lebih besar sehingga penyerapan akan menjadi lebih baik (Sofith, Dini & Rahmadaniati Effendi, 2020). Selanjutnya, bahan berupa serbuk yang telah lolos ayakan diisolasi lebih lanjut sampai menjadi kitin. Untuk mendapatkan kitin dari cangkang keong mas yaitu dengan cara melakukan penghilangan mineral (demineralisasi), tahap penghilang protein (deproteinisasi), dan untuk mendapatkan kitosan dari hasil kitin sebelumnya yaitu dilakukan metode transformasi (deasetilasi) dari kitin menjadi kitosan.

3.4.2 Pembuatan Kitosan

Dalam proses sintesis kitosan ada beberapa tahap yang harus dilakukan. Tahap yang dilakukan yaitu 3 tahapan diantaranya yaitu proses demineralisasi, deproteinisasi. Setelah kedua tahap tersebut dilakukan dilanjutkan dengan proses deasetilasi untuk mendapatkan kitosan. Urutan dalam pembuatannya yaitu sebagai berikut:

1. Demineralisasi

Serbuk cangkang keong mas yang sudah dihaluskan kemudian diayak dengan ayakan mesh no.80, lalu ditimbang sebanyak 200 gram dan ditambahkan larutan HCl 1,5 M dengan perbandingan 1;5 (b/v). Serbuk cangkang keong mas dan larutan HCl 1,5 M dicampurkan dalam gelas kimia kemudian direndam selama 72 jam. Setelah proses perendaman selesai, dipanaskan pada suhu 60°C selama 4 jam sambil dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan pengadukan 100 rpm. Setelah proses pengadukan selesai campuran disaring, dan residu hasil penyaringan

dicuci dengan aquadest hingga pH netral dan disaring kembali. Residu yang sudah netral dikeringkan menggunakan oven pada suhu 80°C hingga berat konstan. Sehingga diperoleh serbuk cangkang keong mas tanpa mineral (Agustina *et al.*, 2015)

2. Deproteinisasi

Serbuk cangkang keong mas dari hasil demineralisasi lalu ditambahkan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10 (b/v) antara sampel dan pelarut. Campuran dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 4 jam sambil dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm. Setelah proses pengadukan selesai campuran disaring dan residu hasil penyaringan dicuci dengan aquadest hingga pH netral dan disaring kembali. Residu yang sudah netral dikeringkan dalam oven menggunakan pada suhu 80°C hingga berat konstan. Sehingga didapatkan hasil sampel kitin dari cangkang keong mas (Agustina *et al.*, 2015)

3. Deasetilasi

Hasil yang diperoleh dari hasil proses deproteinisasi (kitin) dilanjutkan dengan proses deasetilasi dengan menggunakan NaOH 60% dengan perbandingan 1:10 (b/v). Lalu, campuran diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan pengadukan 300 rpm dan dipanaskan pada suhu 80°C dengan variasi waktu pengadukan yang digunakan yaitu 3 jam, 4 jam, dan 5 jam. Selanjutnya, residu disaring dan dicuci dengan aquadest hingga pH netral. Residu yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C hingga berat konstan. Setelah itu, didapatkan hasil sampel kitosan dari cangkang keong mas (Agustina *et al.*, 2015)

3.5 Karakterisasi Kitosan

1. Randemen

Untuk mengetahui randemen kitosan yaitu dapat ditentukan dengan cara menghitung perbandingan antara berat kitosan yang dihasilkan dengan berat cangkang keong mas.

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{massa kitosan kering (g)}}{\text{massa kitin kering (g)}} \times 100\%$$

2. Kadar Air

Salah satu parameter yang sangat penting untuk menentukan mutu dari kualitas kitosan yang dihasilkan adalah kadar air. Dimana standar mutu kadar air kitosan yang telah ditetapkan oleh *Proton Laboratory* adalah $\leq 10\%$. Metode AOAC (*Association of*

Analytical Communities) merupakan metode yang dilakukan untuk pengujian kadar air. Metode AOAC (*Association of Analytical Communities*) dilakukan dengan cara pemanasan sebagai berikut: sampel ditimbang dalam cawan porselin yang telah diketahui sebanyak 0,5 gram. Kemudian sampel dipanaskan dengan oven pada suhu 100-105°C selama 1-2 jam. Setelah sampel dipanaskan selanjutnya didinginkan dalam desikator selama kurang lebih 30 menit lalu ditimbang. Sampel dipanaskan kembali ke dalam oven, kemudian di dinginkan menggunakan desikator dengan waktu yang sama dan diulangi sampai berat sampel konstan (Agustina *et al.*, 2015). Untuk mengetahui kadar air dapat dilakukan perhitungan dengan rumus kadar air sebagai berikut:

$$\frac{a - b}{c} \times 100\%$$

Keterangan:

a: berat wadah + sampel basah (g)

b: berat wadah + sampel kering (g)

c: berat sampel basah (g)

3. Kadar Abu

Kadar abu merupakan parameter untuk mengetahui mineral yang terkandung pada kitosan. Standar mutu kadar abu kitosan menurut *Proton Laboratory* adalah ≤ 2 %. Pengujian kadar abu dapat dilakukan dengan cara kurs porselen korong ditimbang sebelum dimasukkan ke dalam oven, lalu dipanaskan di dalam oven dengan suhu 105°C selama 1 jam. Perlakuan diulang sampai menentukan bobot konstan. Sampel kitosan 0,5 gram dimasukkan dalam kurs porselen yang sudah diketahui beratnya dan di *furnace* pada suhu 600°C selama 2 jam. Kitosan yang telah diabukan dimasukkan ke dalam desikator hingga suhu ruangan lalu ditimbang berat sampelnya, perlakuan dilakukan sampai mendapatkan berat konstan (Masindi & Herdyastuti, 2017). Kadar abu dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{B_2 - B_1}{B_S} \times 100\%$$

Keterangan:

B₁ = berat kurs kosong (g)

B₂ = berat (sampel + kurs) setelah diabukan (g)

B_S = berat sampel (g)

4. Kelarutan

Kelarutan kitosan merupakan salah satu parameter uji yang dilakukan untuk dapat dijadikan sebagai standar penilaian mutu kitosan. Semakin tinggi kelarutan kitosan berarti semakin tinggi nilai mutu kitosan yang dihasilkan semakin baik. Kelarutan kitosan dilakukan dengan cara yaitu kitosan dilarutkan ke dalam asam asetat konsentrasi 2% dengan perbandingan 1:100 (b/v) (Agustina *et al.*, 2015)

5. Derajat Deasetilasi

Penambahan basa kuat digunakan untuk mengubah kitin menjadi kitosan. Pada proses perubahan dari kitin ke kitosan tersebut terjadi pemutusan ikatan kovalen antara gugus asetil dengan nitrogen pada gugus asetamida kitin sehingga berubah menjadi gugus amina, proses tersebut dinamakan proses deasetilasi. Derajat deasetilasi kitosan ditentukan dengan menggunakan *Fourier Transform Infra-Red Spektrofotometerbase (FTIR)*. Pada analisis, sampel kitosan dicampur dengan KBr sehingga terbentuk pelet. Pelet KBr yang diperoleh kemudian dimasukan ke tempat cuplikan dan direkam spectrum serapan inframerahnya pada bilangan gelombang (frekuensi) 400-4000 cm^2 (Arsyi *et al.*, 2018). Selain menggunakan FTIR dapat menggunakan metode titrimetri HBr, FDYV-Spektrometri, XRD dan Spektroskopi ^1H NMR (Khan *et al.*, 2002). Histogram yang diperoleh dari analisis FTIR digunakan untuk menghitung derajat deasetilasi dari kitosan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

P_0 : Puncak tertinggi, dan

P : puncak terendah

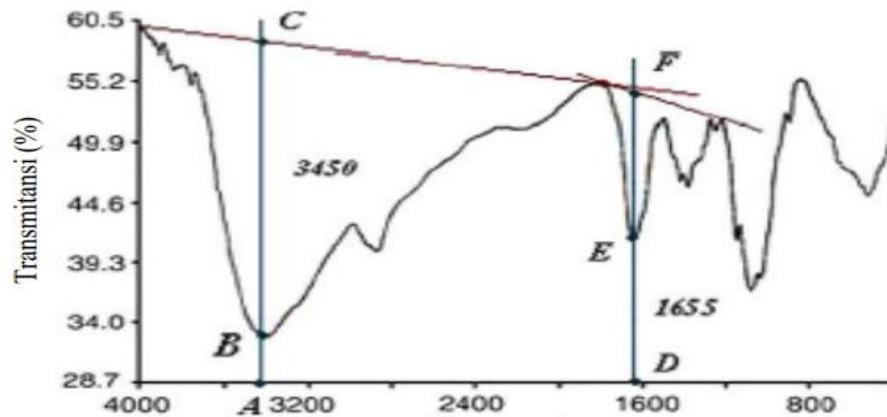
Perbandingan absorbansi pada 1.655 cm^{-1} dengan absorbansi 3.450 cm^{-1} digandakan satu per standar N-deasetilasi kitosan (1,33). Dengan mengukur absorbansi pada puncak yang berhubungan, nilai perentase N-deasetilasi dihitung dengan rumus berikut:

$$\%DD : \%DD = 1 \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} - \frac{1}{1,33} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

A_{1655} : nilai absorbansi pada 1655 cm^{-1}

A_{3450} : nilai absorbansi pada 3450 cm^{-1}

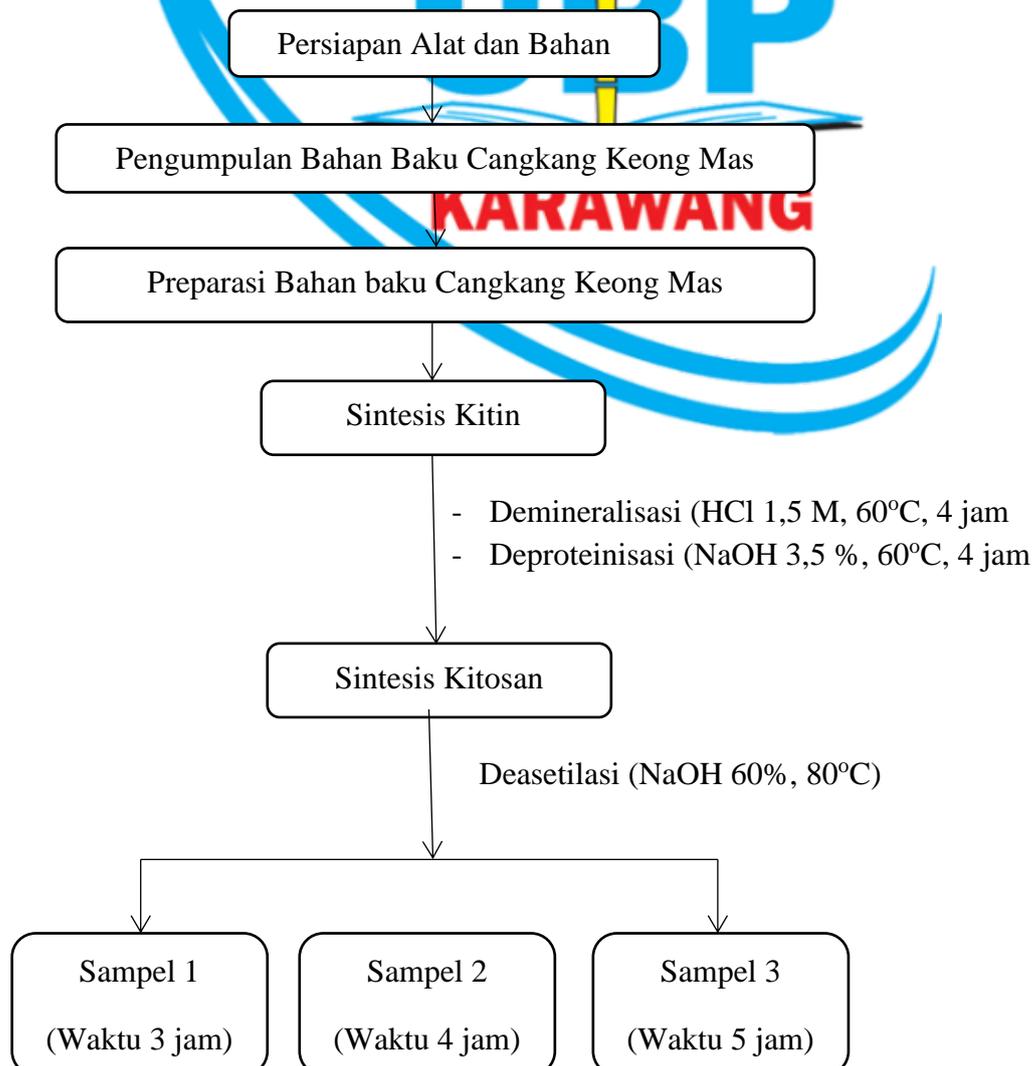


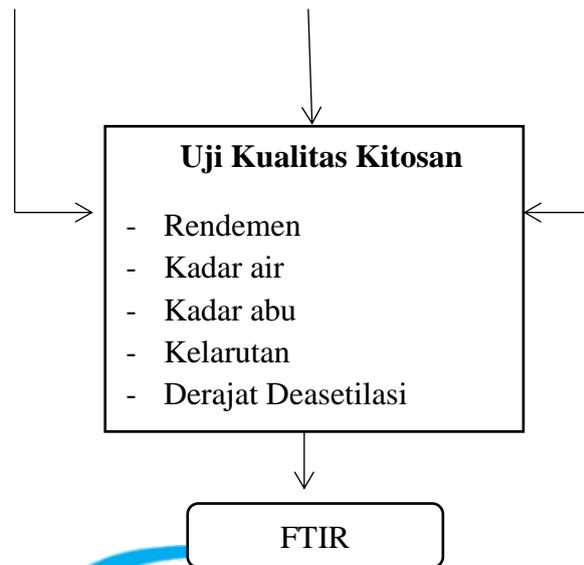
Bilangan gelombang (cm^{-1})

Gambar 3.1 Contoh Penarikan garis dengan metode based line (Baxter, 1992.)

Penarikan garis A didapatkan dari peroleh data serapan 3450 sedangkan garis B didapatkan dari peroleh serrapan puncak 1665 (Baxter *et al.*, 1992).

3.6 Diagram Alir





3.7 Analisis Data

Analisis data kualitas dari Rancang Acak Kelompok (RAL) yaitu melibatkan pengamatan berulang terhadap suatu objek. Perlakuan yang diberikan yaitu pada variasi waktu deasetilasi kitosan 3 jam, 4 jam, dan 5 jam. Tiap variasi perlakuan diperiksa terhadap pengujian kualitas kitosan dengan pengujian kadar air, kadar abu, kelarutan, dan derajat deasetilasi. Kemudian, dilanjutkan dengan pengujian karakteristik kitosan menggunakan *Fourier Transform Infra-Red Spectrophotomer* (FTIR).