

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan meliputi penyiapan alat, preparasi bahan, fotodegradasi PVC tanpa dan dengan penambahan aditif benzophenon, biodegradasi PVC tanpa dan dengan aditif kitin oleh bakteri *Clostridium* dan analisa polimer sebelum dan sesudah proses degradasi.

3.1. Peralatan.

Penyiapan ruang fotodegradasi berupa kotak yang dilengkapi dua buah lampu UV dekat dengan daya 15 Watt dan range λ antara 300-350 nm berintensitas maksimum. Penyiapan ruang biodegradasi berupa kotak kaca tertutup rapat untuk meminimalkan keberadaan oksigen dalam ruang tersebut. Viskosimeter Ostwald dan stopwatch untuk menentukan berat molekul PVC. Alat timbang elektronik dengan ketelitian sampai 0,1 mg untuk menentukan berat kering film PVC sebelum dan sesudah proses degradasi. Spektrofotometer UV-Vis untuk menunjukkan secara kualitatif terjadinya fotodegradasi oksidatif dan biodegradasi anaerobik. Spektrofotometer IR untuk menilai terjadinya fotodegradasi dan biodegradasi secara kualitatif maupun kuantitatif. Lempeng kaca, pengaduk magnetik dan pengaduk kaca untuk membuat film PVC. Alat-alat gelas lain yang diperlukan seperti tabung reaksi besar beserta sumbat karetnya sebagai tempat tumbuhnya bakteri *Clostridium* dalam media agar. Selain itu tabung reaksi dengan sumbat karetnya juga digunakan sebagai tempat fotodegradasi film PVC dalam larutan NaOH untuk mengukur banyaknya HCl yang terbebaskan selama fotodegradasi

berlangsung dengan metoda titrasi asam basa. Untuk titrasi volumetrik digunakan mikroburet dengan ketelitian sampai 0,1 mL. Ruangan pemanas (oven) untuk pengeringan.

3.2. Bahan-bahan.

Polivinil klorida (PVC) sebagai polimer yang akan didegradasi. Aseton sebagai pelarut PVC dalam proses pembuatan film PVC. Benzophenon sebagai aditif pada proses fotodegradasi. Kitin sebagai aditif pada proses biodegradasi. Bahan kimia pendukung preparasi media Agar-Daging Rebus Robertson seperti agar, daging sapi, glukosa, Bacto Pepton, larutan 4% NaOH, asam askorbat dan larutan 0,1% metil biru. Reagensia 1% H₂O₂, 0,004% metil biru, 1% gentian violet dan 1% malachite green untuk uji mikrobiologi bakteri Clostridium. Larutan 0,04 M HCl, 0,04 M NaOH dan indikator phenolphthalin (PP) untuk mengukur banyaknya HCl terbebaskan selama proses fotodegradasi melalui titrasi asam basa.

3.3. Prosedur Kerja.

3.3.1. Preparasi sampel.

3.3.1.1. Preparasi kitin dari kulit udang.

Sejumlah kulit udang yang sudah dicuci bersih dilakukan perlakuan awal dengan perendaman dalam larutan 1% NaOH selama semalam dan dilanjutkan dalam larutan 1% HCl selama semalam. Hal tersebut dimaksudkan untuk menghilangkan protein terikat pada molekul kitin dan dekalsinasi kitin. Kemudian kitin yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada 60-70°C dan ditumbuk halus. Untuk membuktikan adanya kitin dalam

kulit udang, hasil preparasi tersebut ditentukan pola spektra IR-nya dan dibandingkan dengan spektra IR kitin dalam literatur.

3.3.1.2. Pembuatan Film PVC.

Dalam penelitian ini dibuat tiga jenis film PVC yaitu film PVC tanpa aditif, film PVC beraditif benzophenon dan film PVC beraditif kitin. Film PVC tanpa aditif dibuat dengan melarutkan 4 gram resin PVC dalam 35 mL aseton, dilakukan pengadukan selama 24 jam, didiamkan selama 8 jam dan dicetak pada lempeng kaca seluas 20 x 20 cm² dengan penguapan pelarut. Film PVC beraditif dibuat dengan cara yang sama dan penambahan aditif dilakukan pada saat pelarutan resin PVC yaitu sebesar 0,5% berat benzophenon untuk film PVC beraditif benzophenon dan 5% berat kitin untuk film PVC beraditif kitin.

3.3.1.3. Pembuatan media agar-daging rebus Robertson.

Sebelum melangsungkan biodegradasi PVC mula-mula perlu disiapkan media untuk melangsungkan proses biodegradasi. Media yang dipakai adalah media agar-Daging Rebus Robertson yang dapat membuat suatu lingkungan yang cocok bagi bakteri anaerob *Clostridium* untuk tumbuh disitu. Pembuatan media agar-Daging Rebus Robertson dimulai dari pemblenderan daging sapi segar bebas lemak sebanyak 40 gram (1 inci) sampai lembut benar, lalu direbus dengan 100 mL aquadest selama setengah jam. Selagi dalam keadaan panas tambahkan kedalamnya 1,5 gram agar, 0,2 gram glukosa, 0,5 gram NaCl, 0,4 mL larutan 0,1% metilenblue, 0,2 gram asam askorbat dan 0,2 gram pepton. Dalam keadaan panas larutan media dituangkan dalam tabung reaksi besar yang berisi plat PVC sampai kira-kira setengah penuh. Setelah itu mulut tabung disumbat dengan kapas sampai benar-benar menutupi mulut tabung, lalu kapas dibakar untuk

menghilangkan oksigen dalam tabung dan setelah kapas diluar mulut tabung habis terbakar, sisa kapas ditekan ke bagian tengah tabung. Tepat diatas sisa kapas yang terbakar diberikan asam askorbat secukupnya kemudian dituangkan larutan 4% NaOH sampai hampir penuh dan kemudian disumbat dengan karet sampai benar-benar rapat. Tabung tersebut ditempatkan dengan posisi terbalik diruang gelap dalam ruang kaca steril. Kuman Clostridium akan tumbuh subur setelah 4 hari beradaptasi pada media tersebut yang ditandai dengan munculnya gas berbau tak sedap dan penghitaman media agar. Bakteri Clostridium merupakan bakteri pembentuk spora, penghasil enzim reduktase dan bakteri gram positif artinya dinding selnya mengandung kadar lemak yang rendah. Keberadaan Bakteri Clostridium dapat diuji secara mikrobiologi berdasarkan sifat-sifat bakteri tersebut.⁽¹⁹⁾

3.3.2. Analisis mikrobiologi bakteri Clostridium.

3.3.2.1. Preparasi smeer.

Smeer merupakan goresan kering media yang telah ditumbuhi bakteri pada lempeng kaca. Media agar padat dibuat emulsi dengan penambahan sedikit akuades. Sebelum digunakan untuk preparasi smeer lempeng kaca disterilkan melalui pencucian dengan alkohol atau aseton. Emulsi media bakteri Clostridium digoreskan pada lempeng kaca dengan batang pengaduk yang juga sudah disterilkan dengan api pemanas. Goresan diperlebar dan dibiarkan kering pada 50°C selama 10-15 menit dan smeer terbentuk.

3.3.2.2. Uji noda gram.

Reagensia 1% gentian violet dalam larutan 5% NaHCO₃ diteteskan pada smeer dan dibiarkan selama satu menit. Setelah satu menit berlalu smeer disiram dengan akuades. Selanjutnya larutan 0,5% I₂ diteteskan pada smeer dan dibiarkan selama satu menit.

Setelah satu menit berlalu smear disiram dengan akuades. Kemudian smear ditetesi alkohol 95% sampai alkohol melampaui lempeng kaca. Akhirnya lempeng kaca dicuci dengan akuades dan diamati adanya noda yang terjadi. Bakteri Clostridium merupakan bakteri gram positif yang akan memberikan noda berwarna ungu gelap, sedangkan bila tidak terbentuk noda ungu gelap berarti bakteri tersebut adalah gram negatif dan bukan Clostridium.

3.3.2.3. Uji noda spora.

Reagensia 1% malachite green ditetaskan di atas smear dan dipanasi di atas api tetapi jangan sampai menguap/kering selama 2-3 menit. Setelah itu lempeng kaca dicuci dengan akuades dan diamati noda yang terjadi. Bakteri Clostridium merupakan bakteri pembentuk spora sehingga akan meninggalkan noda berwarna hijau sedangkan bila tidak terbentuk noda berwarna hijau berarti bakteri tersebut bukan pembentuk spora dan bukan Clostridium.

3.3.2.4. Uji reduktase.

Uji ini bertujuan mengetahui adanya enzim reduktase yang dihasilkan oleh bakteri Clostridium. Sampel emulsi media diambil sebanyak 10 mL dan ditambahkan 0,5 mL larutan 0,004% metil biru. Kemudian larutan itu didiamkan dan diamati pelunturan warnanya. Semakin cepat media melunturkan warna metil biru berarti jumlah bakteri Clostridium semakin banyak. Apabila sudah lebih dari dua hari warna metil biru tidak hilang berarti tidak terdapat bakteri Clostridium.

3.3.2.5. Uji Oksidase.

Uji ini bertujuan mengetahui tidak adanya enzim oksidase yang dihasilkan oleh bakteri Clostridium sp. Sampel emulsi media diambil sebanyak 10 mL dan ditambahkan

1 mL larutan 1% H₂O₂. Kemudian larutan itu didiamkan dan diamati terbentuknya gelembung-gelembung gas. Bakteri Clostridium tidak menghasilkan enzim oksidase sehingga tidak mampu menguraikan H₂O₂.⁽¹⁹⁾

3.3.3. Degradasi Sampel.

3.3.3.1. Fotodegradasi dengan sinar UV.

Film PVC yang sudah dipotong-potong berbentuk pita dimasukkan dalam ruang fotodegradasi dan disinari UV selama waktu 30, 50, 70, 90 dan 110 jam.

3.3.3.2. Biodegradasi Anaerob dengan Bakteri Clostridium.

Film PVC yang sudah dipotong-potong berbentuk pita dimasukkan dalam ruang biodegradasi dan dibiarkan kontak dengan bakteri Clostridium pada media agar daging rebus Robertson dalam tabung reaksi tertutup rapat selama waktu 3, 4, 5 dan 6 minggu.

3.3.4. Penentuan Tingkat Degradasi.

3.3.4.1. Perubahan berat kering film PVC.

Film PVC yang sudah dipotong-potong berbentuk pita-pita, masing-masing ditimbang dengan alat timbang elektronik dengan ketelitian sampai 0,1 mg. Setelah itu pita-pita PVC didegradasi selama waktu tertentu dan kemudian masing-masing ditimbang kembali. Dengan data berat awal pita PVC dan berat pita PVC setelah degradasi pada waktu tertentu maka dapat ditentukan persen penurunan berat kering PVC, orde reaksi degradasi dan konstanta laju degradasi PVC yang selengkapnya dapat dilihat pada lampiran A.

3.3.4.2. Penentuan jumlah HCl terbebaskan selama fotodegradasi PVC.

Pita PVC dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 10 mL larutan 0,04 M NaOH, disinari UV selama waktu tertentu. Setelah fotodegradasi PVC kemudian larutan NaOH tersebut dititrasikan dengan HCl standar 0,04 M sehingga jumlah HCl yang terbebaskan selama fotodegradasi PVC dapat ditentukan. Uraian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran B.

3.3.4.3. Perubahan berat molekul dengan viskosimetri.

Sampel PVC dilarutkan dalam aseton dengan konsentrasi 2, 5, 10, 15 dan 20 mg/mL, diukur massa jenis larutannya dengan piknometer dan diukur viskositasnya dengan viskosimeter Ostwald dengan mengukur waktu alirnya. Kemudian dengan persamaan Mark Hauwink akan diperoleh berat molekul relatif polimer seperti terlihat pada lampiran C.

3.3.4.4. Pola spektra UV.

Sampel PVC sebelum dan sesudah degradasi dilarutkan dalam aseton dengan konsentrasi 15 mg/mL dan ditentukan spektranya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan pembanding aseton.

Sampel benzophenon sebelum dan sesudah fotodegradasi dilarutkan dalam aseton dengan konsentrasi 15 mg/mL dan ditentukan spektranya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan pembanding aseton. Hasil spektra UV benzophenon sebelum dan sesudah fotodegradasi terlihat pada lampiran D.

3.3.4.5. Pola spektra IR.

Sampel PVC dan KBr dioven, ditimbang sebanyak 1 mg sampel digerus dengan 50 mg KBr hingga homogen, lalu dibuat pelet. Pelet ditempatkan dalam ruang sampel spektrofotometer IR, lalu dibuat spektra IR dengan pembanding udara. Pola spektra IR diukur intensitasnya pada bilangan gelombang untuk ikatan C=O atau C-Cl sebagai tolok ukur tingkat degradasi PVC. Hasil spektra IR selengkapnya dapat dilihat pada lampiran D. Cara pengukuran intensitas puncak pada spektra IR dan data-data intensitas selengkapnya terlihat pada lampiran E.^(14,15,18,20)

