

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini meliputi penyiapan alat, preparasi bahan, fotodegradasi film PET tanpa dan penambahan aditif benzofenon dan naftalen, biodegradasi film PET tanpa dan dengan aditif kitin oleh bakteri *Clostridium Sp* 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 di dalam ruang tersebut. Alat timbang elektronik (Mettler) dengan ketelitian sampai 0,1 mg untuk menentukan berat kering film PET sebelum dan sesudah proses degradasi. Spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan secara kualitatif terjadinya fotodegradasi oksidatif. Spektrofotometer FTIR untuk menilai terjadinya fotodegradasi dan biodegradasi secara kualitatif maupun kuantitatif. pemanas (heater), teflon (PTFE), dan pengaduk kaca untuk membuat film PET. Alat-alat gelas lain yang diperlukan seperti tabung reaksi besar beserta sumbat karetinya sebagai tempat tumbuhnya bakteri *Clostridium Sp* dalam media agar dan ruangan pemanas (oven) untuk pengeringan.

3.2. Bahan-bahan

Polietilen Tereftalat (PET) sebagai polimer yang akan didegradasi. Benzofenon dan naftalen sebagai aditif pada proses fotodegradasi. Kitin sebagai aditif pada proses biodegradasi. Campuran fenol + trikloroetilen sebagai pelarut PET. 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, 0,0004% metil biru, 1% malachite green untuk uji mikrobiologi bakteri *Clostridium Sp.*

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 literature.

3.3.1.2. Pembuatan Film PET

Dalam penelitian ini dibuat empat jenis film PET yaitu film PET tanpa aditif, film PET beraditif benzofenon, film PET beraditif naftalen, dan film PET beraditif kitin. Film PET tanpa aditif dibuat dengan melelehkan pada alat pelelehan yang dilapisi PTFE pada temperatur 256°C , dilakukan pengadukan selama 1 menit kemudian diikuti dengan pendinginan secara tiba-tiba di dalam waterbath. Film PET beraditif dibuat dengan cara yang sama, ketika resin PET meleleh/mencair ditambahkan aditif bezofenon 1 % dan naftalen 1 % untuk film fotodegradabel dan aditif kitin 4 % untuk film biodegradabel. Dengan demikian diperoleh film tipis (0,31 mm) yang keras dan transparan.

3.3.1.3. Pembuatan media agar-daging rebus Robertson

Sebelum melangsungkan biodegradasi PET 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 Sp* untuk tumbuh pada media. Pembuatan media Agar-Daging Rebus Robertson dimulai dari pemblenderan daging sapi segar bebas lemak sebanyak 100 gram sampai lembut benar, lalu direbus dengan 250 ml aquadest selama setengah jam. Selagi dalam keadaan panas ditambahkan kedalamnya 3,75 gram agar-agar, 0,5 gram glukosa, 1,25 gram NaCl, 0,5 gram pepton, 0,05 gram asam askorbat, dan 0,4 ml larutan 1 % metilinblue. Dalam keadaan panas larutan media

dituangkan dalam tabung reaksi besar yang berisi plat PET 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 di luar mulut tabung habis terbakar, sisa kapas ditekan kebagian tengah tabung. Tepat di atas 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 di ruang gelap dalam ruang kaca steril. Bakteri *Clostridium* akan tumbuh subur setelah 4 hari beradaptasi pada media tersebut 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 smear

Smear merupakan goresan kering media yang telah ditumbuhi bakteri pada lempeng kaca. Media agar dibuat emulsi dengan penambahan sedikit aquadest. Sebelum digunakan untuk preparasi smear 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 smear terbentuk.

3.3.2.2. Uji noda gram

Reagensia 1 % gentian violet dalam larutan 5 % NaHCO₃ diteteskan pada smear dan dibiarkan selama satu menit. Setelah satu menit berlalu smear disiram dengan aquadest. Selanjutnya larutan 0,5 % I₂ diteteskan pada smear dan dibiarkan selama satu menit. Setelah satu menit berlalu smear disiram dengan aquadest. Kemudian smear disirami alkohol 95 % sampai alkohol melampaui lempeng kaca. Akhirnya lempeng kaca dicuci dengan aquadest dan diamati adanya noda yang terjadi. Bakteri *Clostridium* merupakan bakteri gram positif yang akan memberikan noda berwarna ungu gelap, Sedangkan tidak terbentuk noda ungu gelap berarti bakteri tersebut gram negatif dan bukan *Clostridium*.

3.3.2.3. Uji noda spora

Reagensia 1 % malachite green diteteskan di atas smear dan dipanasi di atas api tetapi jangan sampai menguap/kering selama 2-3 menit. Setelah lempeng kaca dicuci dengan aquadest 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 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*. 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 PET yang sudah dipotong-potong berbentuk pita berukuran 3 x 1 cm dimasukkan ke dalam ruang fotodegradasi. Jarak film PET ke lampu UV 10 cm dengan suhu ruangan 52 °C dalam kondisi kering dan disinari selama waktu 24, 48, dan 72 jam.

3.3.3.2. Biodegradasi anaerob dengan bakteri *Clostridium*

Film PET yang sudah dipotong-potong berbentuk pita berukuran 3x1 cm dimasukkan ke dalam ruang biodegradasi dan dibiarkan kontak dengan bakteri *Clostridium* pada media Agar-Daging Rebus Robertson dalam tabung reaksi tertutup rapat selama 21, 28, 35, dan 42 hari.

3.3.4. Penentuan Tingkat Degradasi

3.3.4.1. Perubahan berat kering film PET

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

3.3.4.2. Pola spektra UV

Sampel PET sebelum dan sesudah degradasi dilarutkan dalam larutan campuran fenol dan trikloroetana dengan konsentrasi 15 mg/ml dan ditentukan spektranya dengan spektrofotometer UV-Vis (Milton Roy 3000 array) dengan pembanding larutan campuran fenol dan trikloroetana.

Sampel naftalen 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 naftalen sebelum dan sesudah fotodegradasi terlihat pada lampiran B.

3.3.4.3. Pola spektra FTIR

Spektrum IR diperoleh dengan menggunakan Shimadzu Hyper FTIR-820 IPC. Film (0,18 mm) sebelum dan sesudah degradasi ditempatkan dalam ruang sampel spektrofotometer FTIR kemudian dibuat spektrum IR dengan pembanding udara. Hasil spektra IR selengkapnya dapat dilihat pada lampiran B.

