

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini meliputi penyiapan alat, preparasi bahan, biopolimerisasi bioselulosa nata de soya, biodegradasi bioselulosa nata de soya oleh bakteri *Clostridium sp*, analisis bioselulosa saat biopolimerisasi dan setelah biodegradasi.

3.1. Peralatan dan Bahan

3.1.1. Peralatan

Alat-alat yang digunakan meliputi wadah plastik, panci, pengaduk, kompor untuk preparasi media bioselulosa nata de soya. Alat timbang elektronik (Mettler AT 200) yang berfungsi untuk menentukan berat basah dan kering bioselulosa serta berat kering bioselulosa sebelum dan setelah biodegradasi. Ruang biodegradasi yang merupakan ruang kaca yang tertutup rapat untuk meminimalkan keberadaan O₂ dalam ruang tersebut yang digunakan untuk menyimpan sampel yang akan dibiodegradasi dalam kondisi anaerob. Spektrofotometer FTIR Shimadzu Hyper 820 IPC, Tensile Tester PT Linson untuk analisis kekuatan tarik, spektrofotometer UV/VIS untuk analisis kadar gula reduksi, serta peralatan gelas.

3.1.2. Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk pembuatan bioselulosa nata de soya meliputi sukrosa, limbah cair tahu dari pabrik tahu di Jl. Tandang RT 06 RW 07

Semarang, Diamonium fosfat ((NH₄)₂PO₄), CH₃COOH serta stater *Acetobacter xylinum* dari BPPI Semarang. Bahan kimia pendukung preparasi media agar-daging rebus Robertson meliputi agar murni, daging sapi, glukosa, bactopecton, NaCl, asam askorbat, dan larutan 0,1% metil biru serta aquadest.

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Biopolimerisasi Bioselulosa Nata de Soya

Biopolimerisasi meliputi persiapan media biopolimerisasi dan proses biopolimerisasi. 10 L limbah cair tahu yang telah disaring dengan kain saring, dipanaskan hingga mendidih (dibuang buihnya jika ada), dibiarkan selama 10 menit kemudian ditambahkan 100 g sukrosa, 50 g (NH₄)₂PO₄, dipanaskan lagi sampai mendidih, setelah mendidih ditambahkan 50 mL asam asetat hingga pH sebesar 4,5. Kemudian larutan limbah cair tahu dituangkan ke dalam 5 wadah plastik dengan masing-masing wadah berisi 2 L (V₀) dan didinginkan sebagai media biopolimerisasi (Tabel 3. 1.) Selanjutnya untuk memulai proses biopolimerisasi, ke dalam media biopolimerisasi yang terdapat dalam 5 wadah plastik yang sudah dingin ditambahkan stater *Acetobacter xylinum* masing-masing wadah sebanyak 200 mL. Kelima wadah plastik yang berisi media biopolimerisasi dengan volume awal V₀ dan stater ditutup dengan kertas bersih, kemudian diinkubasi dengan variasi waktu masing-masing 2, 4, 6, 8, 10 hari pada temperatur kamar. Bioselulosa yang dihasilkan diangkat dari wadah setelah 2, 4, 6, 8, 10 hari. Selanjutnya ditimbang berat basah bioselulosa (W_{basah}). Sisa media biopolimerisasi ditentukan volumenya (V_t). Bioselulosa dikeringkan dengan

bantuan sinar matahari selama 3 hari sehingga diperoleh bioselulosa tanpa kandungan air. Ditimbang berat kering bioselulosa (W_{kering}).

Tabel 3.1. Waktu inkubasi untuk setiap media biopolimerisasi

| Waktu inkubasi (hari) | Media biopolimerisasi | Volume media biopolimerisasi awal (V_0) |
|-----------------------|-----------------------|---|
| 2 | Wadah plastik 1 | 2 L |
| 4 | Wadah plastik 2 | 2 L |
| 6 | Wadah plastik 3 | 2 L |
| 8 | Wadah plastik 4 | 2 L |
| 10 | Wadah plastik 5 | 2 L |

3.2.2. Karakterisasi Bioselulosa Nata de Soya

3.2.2.1. Analisis Spektra FTIR

Untuk karakterisasi bioselulosa kering yang dihasilkan pada tiap variasi waktu 2, 4, 6, 8, 10 hari biopolimerisasi dianalisis perubahan pola spektra dan interaksi gugus-gugus yang ada dengan spektrofotometer FTIR Shimadzu Hyper 820 IPC di laboratorium Kimia UGM Yogyakarta.

3.2.2.2. Analisis Kadar Gula

Untuk mengetahui apakah gula yang ada pada media biopolimerisasi telah berubah menjadi bioselulosa maka larutan sisa media biopolimerisasi untuk tiap variasi waktu dianalisis kadar gula reduksi dan kadar gula total dengan metode

Nelson Soumogyi^[20]. Analisis dilakukan di laboratorium Fakultas Teknologi Hasil Pertanian UGM Yogyakarta.

3.2.2.3. Uji Kekuatan Tarik

Untuk mengetahui besar kekuatan tarik dari bioselulosa nata de soya kering dilakukan pengukuran kekuatan tarik dengan menggunakan alat Tensile tester PT Linson di PT Pura Barutama Kudus.

3.2.3. Biodegradasi Bioselulosa Nata de Soya

Sebelum melangsungkan biodegradasi, mula-mula perlu disiapkan media untuk melangsungkan proses biodegradasi dan setelah itu baru dilakukan proses biodegradasi.

3.2.3.1. Pembuatan media agar-daging rebus Robertson

Media yang dipakai adalah media agar daging rebus Robertson yang merupakan lingkungan yang cocok bagi bakteri anaerob *Clostridium sp* untuk tumbuh. Pembuatan media agar daging dimulai dengan pemblenderan daging sapi segar sebanyak 100 g sampai lembut benar, lalu direbus dengan 250 ml aquadest selama 30 menit. Selagi dalam keadaan panas ditambahkan ke dalamnya 3,75 g agar; 0,5 g glukosa; 1,25 g NaCl; 0,5 g bactopecton; 0,05 g asam askorbat dan 0,4 ml larutan metil biru. Dalam keadaan panas larutan media dituangkan ke dalam tabung reaksi besar berisi plat selulosa sampai setengah penuh. Setelah itu mulut tabung disumbat dengan kapas sampai menutupi tabung, lalu kapas dibakar untuk menghilangkan oksigen dalam tabung dan setelah kapas di luar mulut

tabung habis terbakar sisa kapas ditekan ke bagian tengah tabung. Tepat di atasnya diberi asam askorbat dan disumbat dengan karet sampai rapat. Tabung ditempatkan dengan posisi terbalik di ruang kaca.

3.2.3.2. Biodegradasi Sampel Bioselulosa Nata de Soya

Lembaran kering bioselulosa hasil biopolimerisasi selama 10 hari dipotong-potong berbentuk pita berukuran 3x1 cm dan ditimbang berat awalnya. Kemudian dimasukkan ke dalam ruang biodegradasi dan dibiarkan kontak dengan bakteri *Clostridium sp* pada media agar daging rebus Robertson dalam tabung reaksi tertutup rapat selama 1, 5, 7 hari.

3.2.4. Karakterisasi Degradasi

3.2.4.1. Perubahan Berat Kering Bioselulosa Nata de Soya

Bioselulosa yang sudah dipotong berbentuk pita ditimbang berat awalnya. Setelah itu bioselulosa didegradasi dengan waktu tertentu dan ditimbang kembali setelah biodegradasi selesai. Dengan data berat awal dan berat setelah biodegradasi dapat ditentukan persen penurunan berat kering bioselulosa, selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

3.2.4.2. Analisis FTIR

Sampel bioselulosa yang sudah dibiodegradasi selama 1, 5, 7 hari dianalisis dengan Spektrofotometer FTIR Shimadzu Hyper 820 IPC. Spektra yang dihasilkan dianalisis.