

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini meliputi penyiapan alat, preparasi bahan, biopolimerisasi bioselulosa *nata de coco*, analisis kadar gula reduksi, modifikasi bioselulosa *nata de coco* menjadi selulosa asetat, dan analisis struktur bioselulosa *nata de coco* dengan NMR ^1H dan ^{13}C .

Dalam penelitian ini akan diamati variabel-variabel:

1. Variabel-variabel yang dinilai
 - Kadar gula reduksi selama fermentasi.
 - Pergeseran kimia pada spektra NMR.
2. Variabel bebas
Waktu biopolimerisasi
3. Variabel tetap
pH, temperatur dan komposisi bahan.

3.1 Peralatan dan Bahan

3.1.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan meliputi wadah plastik, panci, pengaduk, kompor untuk preparasi media bioselulosa *nata de coco*. Alat timbang elektronik yang berfungsi untuk menentukan berat kering bioselulosa. Gelas beker, pemanas dan pengaduk magnetik untuk preparasi pembuatan selulosa asetat. Spektrofotometer UV-Vis untuk analisis kadar gula

reduksi, spektrometer NMR ^1H dan ^{13}C untuk analisis struktur bioselulosa, serta peralatan gelas lainnya.

3.1.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi air kelapa, starter, ammonium sulfat, sukrosa, asam asetat glasial dan air untuk pembuatan bioselulosa, reagen Nelson-somogyi untuk analisis kadar gula reduksi, asam asetat glasial, asam asetat anhidrid, dan asam sulfat untuk pembuatan selulosa asetat, pelarut DMSO untuk analisis struktur bioselulosa dan aseton untuk analisis struktur selulosa asetat.

3.2 CARA KERJA

3.2.1 Pembuatan selulosa *nata de coco*

Satu liter air kelapa didiamkan selama dua malam dan ditutup kemudian dipanaskan agar mikroba yang dapat mencemari terbunuh. Setelah mendidih, dibiarkan selama ± 5 menit, ditambahkan sukrosa 2,5 % (b/V) dari jumlah air kelapa dan ammonium sulfat sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Larutan dibiarkan sampai mendidih lagi dan dibiarkan selama ± 10 menit. Dimasukkan 1 % (V/V) asam asetat glasial, diaduk hingga pH mencapai 5. Larutan didinginkan dan ditempatkan dalam wadah yang telah disterilkan kemudian dilakukan penambahan 10 % (V/V) starter *Acetobacter xylinum*, ditutup dan diisolasi selama 10 hari pada temperatur kamar. Lembaran nata dicuci sampai asam asetat hilang.

3.2.2 Penentuan kadar gula reduksi

Cairan sisa fermentasi diinjeksi tiap dua hari. Analisis kadar gula reduksi menggunakan metode Nelson-Soumogy dengan standar glukosa dan dilakukan di Laboratorium Proses Produksi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2.3 Sintesis selulosa asetat

Sebanyak 500 mg bioselulosa *nata de coco* ditimbang, kemudian dimasukkan dalam gelas beker 50 mL. Asam asetat glasial ditambahkan secukupnya sampai seluruh permukaan bioselulosa *nata de coco* terendam, kemudian ditutup dan didiamkan selama 60 menit. Contoh di atas selanjutnya dimasukkan dalam gelas beker 50 mL (bagian A) dan direndam dalam penangas air pada suhu 5°C. Sebanyak 5 mL asam asetat glasial, 10 mL asam asetat anhidrid, dan 3 tetes asam sulfat dimasukkan dalam gelas beker bagian A, dan diaduk selama 15 menit. Pengadukan dilanjutkan dengan pengadukan mekanik selama 2 jam pada suhu kamar. Kemudian didiamkan semalam (bagian B). Sebanyak 100 mL aquadest dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL yang dilengkapi dengan pengaduk mekanik. Sampel bagian B dituangkan perlahan-lahan. Hasil sintesis dicuci berkali-kali sampai asamnya hilang, kemudian dikeringkan dalam oven.

3.2.4 Analisis Struktur Bioselulosa dengan NMR ^1H dan ^{13}C .

Bioselulosa *nata de coco* dikeringkan dan dianalisis dengan NMR ^1H 90,0 MHz dan NMR ^{13}C 22,6 MHz bermedan magnet 21138 Gauss menggunakan pelarut DMSO. Selulosa asetat dianalisis dengan alat yang sama dengan pelarut aseton di Laboratorium Dasar Bersama, Universitas Airlangga, Surabaya.

