

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Bahan Penelitian

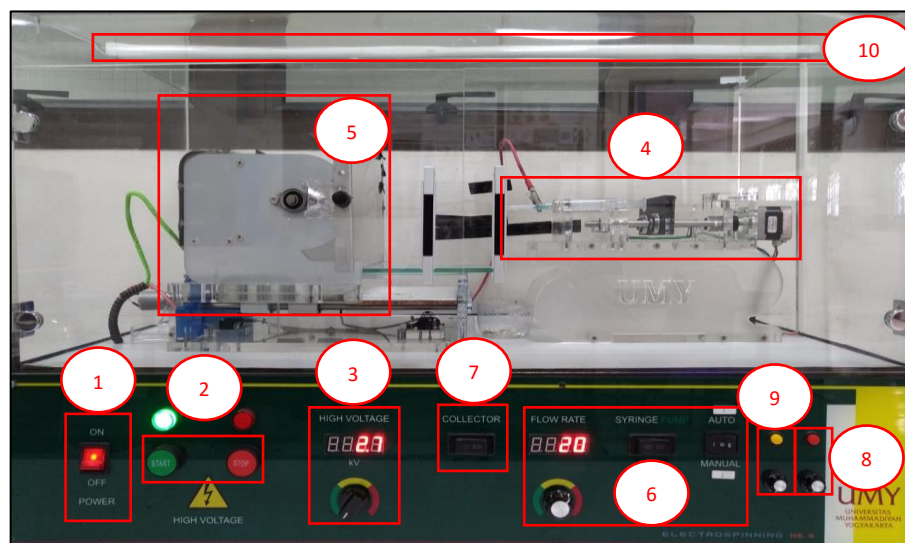
Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian adalah :

1. PVA (*polyvinyl alcohol*) dengan berat molekul 22.000 g/mol. (CV. Multii Kimia, Yogyakarta)
2. Kitosan (Sigma Aldrich, USA)
3. Asam asetat (Merck KGaA, Germany)
4. Aquades (Progo Mulyo, Yogyakarta)

3.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah :

1. Mesin *electrospinning* HK-9 digunakan untuk membuat membran *nanofiber*.



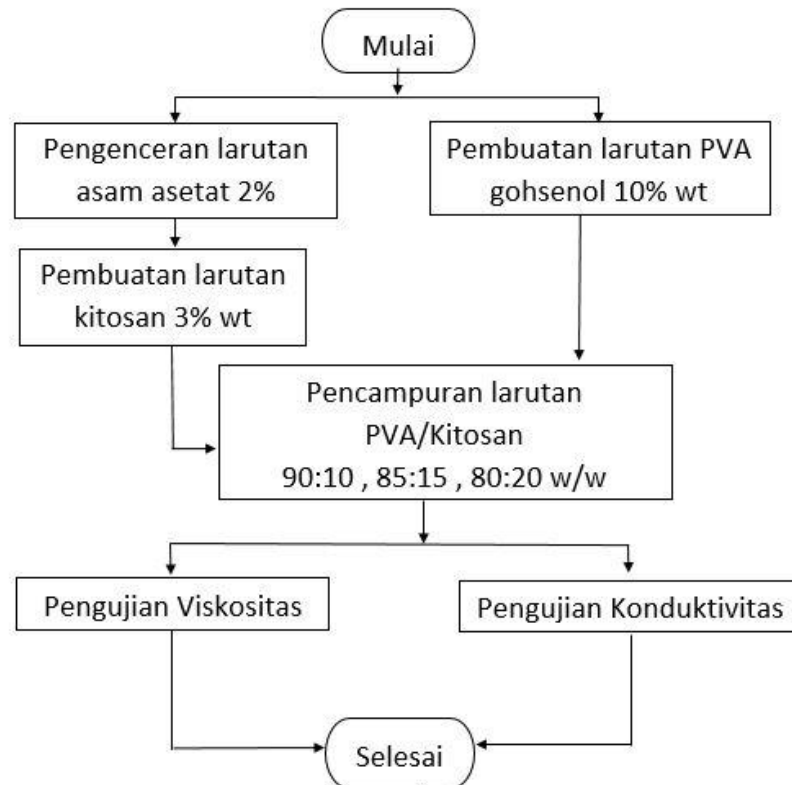
Gambar 3.1. Mesin *electrospinning*

Komponen:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. Tombol ON/OFF | 6. Pengatur laju alir syringe |
| 2. Saklar ON/OFF high voltage | 7. Pengatur kolektor |
| 3. Pengatur tegangan | 8. Pengatur lampu |
| 4. Pengumpan (tempat syringe) | 9. Pengatur putaran drum |
| 5. Kolektor plate/drum | 10. Lampu |

2. Jarum suntik (needle) digunakan sebagai pengumpan kutub positif
3. Syringe pump 10 ml digunakan sebagai tempat penampungan polimer saat proses elektrospinning
4. Alumunium foil digunakan sebagai tempat membran nanofiber hasil elektrospinning berkumpul.
5. Pipet digunakan sebagai pemindah larutan, pengurang dan penambah larutan.
6. Pinset digunakan untuk mengambil membran nanofiber.
7. Spatula digunakan sebagai alat pemindah serbuk PVA
8. Gelas beker 10ml, 50 ml, 100ml digunakan untuk mengukur dan membuat larutan polimer.
9. Timbangan digital digunakan untuk mengukur massa dari bahan bahan yang akan digunakan.
10. Hot plate stirrer digunakan sebagai pemanas dan pencampur larutan.
11. Spinbar digunakan sebagai pengaduk pada saat pembuatan dan pencampuran larutan.
12. Stopwatch digunakan sebagai pengukur waktu pada saat penelitian berlangsung.
13. Termometer digunakan sebagai pengukur suhu larutan selama proses pembuatan.
14. Masker digunakan sebagai penutup hidung dan mulut selama penelitian.
15. Sarung tangan digunakan untuk melindungi tangan dan mengurangi kontaminasi terhadap larutan.
16. Tisu digunakan sebagai pembersih alat alat yang akan digunakan dalam penelitian.

3.3. Pembuatan Larutan



Gambar 3.2. Diagram alir pembuatan larutan, pengujian viskositas dan konduktivitas larutan

3.3.1. Preparasi Alat dan Bahan

Peralatan yang akan digunakan untuk penelitian seperti gelas ukur, *spinbar*, spatula dan *thermometer* dicuci menggunakan air sabun dan disterilisasi menggunakan alkohol, sedangkan untuk bahan dipastikan bahan yang dibutuhkan ada dan mencukupi.

3.3.2. Pembuatan Larutan Asam Asetat

Pembuatan larutan asam asetat dengan cara melarutkan asam asetat dengan konsentrasi 100% menjadi 2%, langkahnya sebagai berikut:

1. Menyiapkan aquades seberat 100 gr menggunakan gelas ukur dan asam asetat seberat 2 gr.
2. Mencampurkan 2 gr asam asetat ke dalam 100 gr aquades dan menaruh di atas *hot plate stirrer*.

3. Memasukan spinbar kedalam gelas ukur dan putar spinbar pada kecepatan 200 rpm selama 15 menit pada suhu ruang.
4. Setelah 15 menit pindah larutan asam ke dalam botol kaca tertutup.

3.3.3. Pembuatan Larutan Kitosan

Pembuatan larutan kitosan 3% dengan cara menyiapkan larutan asam asetat 2% dan kitosan, langkahnya sebagai berikut:

1. Timbang larutan asam asetat sebanyak 50 gr dengan gelas ukur dan kitosan sebanyak 1,5 gr.
2. Memasukan *spinbar* kedalam gelas ukur, menaruh gelas ukur di atas *hot plate steerer*, putar *spinbar* pada kecepatan 200 rpm dan Memasukan kitosan ke dalamnya.
3. Atur *hot plate steerer* pada suhu 75°C dan aduk selama 45 menit.
4. Setelah 45 menit, larutan di diamkan hingga suhu ruang lalu di pindahkan pada botol kaca tertutup.

3.3.4. Pembuatan Larutan PVA

Pembuatan larutan PVA 10% dengan cara melarutkan 10 gr PVA ke dalam 100 gr aquades, langkahnya sebagai berikut:

1. Timbang aquades sebanyak 100 gr dengan gelas ukur dan PVA sebanyak 10 gr.
2. Memasukan *spinbar* kedalam gelas ukur, menaruh gelas ukur di atas *hot plate steerer*, putar *spinbar* pada kecepatan 200 rpm dan Memasukan PVA ke dalamnya.
3. Atur *hot plate steerer* pada suhu 75°C dan aduk selama 60 menit.
4. Setelah 60 menit, larutan didiamkan hingga suhu ruang lalu di pindahkan pada botol kaca tertutup.

3.3.5. Proses Pembuatan Larutan PVA/Kitosan

Proses pembuatan PVA/kitosan menggunakan perbandingan sebagai berikut:

Tabel 3.1 Perbandingan konsentrasi larutan PVA/Kitosan

No	Perbandingan (w/w)	PVA	Kitosan
1	90:10	90	10
2	85:15	85	15
3	80:20	80	20

Proses pembuatannya sebagai berikut:

1. Timbang larutan PVA dan larutan kitosan dengan perbandingan sesuai tabel 3.1.
2. Mencampurkan larutan PVA dan larutan kitosan ke dalam gelas ukur dan Memasukan spinbar.
3. Menaruh gelas ukur yang berisi larutan PVA/kitosan ke atas *hot plate steerer*, atur kecepatan spinbar 200 rpm dengan suhu 75°C selama 60 menit.
4. Setelah 60 menit, larutan didiamkan hingga suhu ruang lalu di pindahkan pada botol kaca tertutup.

3.3.6. Preparasi Sampel Pengujian Viskositas

Pengujian viskositas menggunakan viskometer Brookfield seperti pada gambar 3.5 milik laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada. Preparasi sample sesuai dengan sub bab 3.4.5 dengan ketentuan minimal larutan 75ml. Tujuan dari pengujian viskositas adalah untuk mengetahui berapa nilai viskositas dari masing-masing larutan.

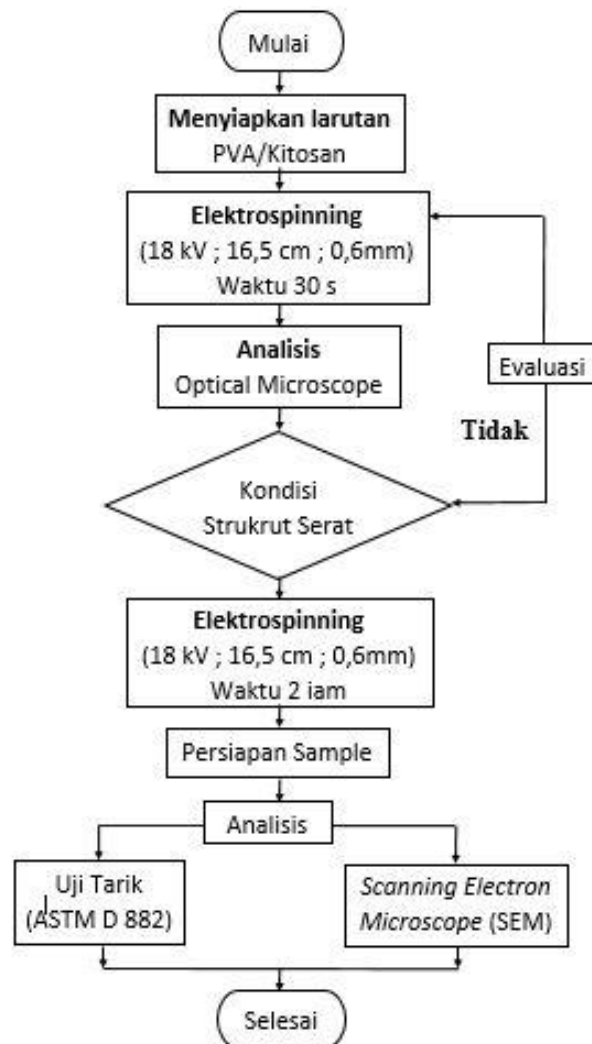


Gambar 3.3. Viskometer Brookfield

3.3.7. Preparasi Sampel Pengujian Daya Hantar Listrik (DHL)

Pengujian daya hantar listrik (DHL) menggunakan konduktometer Senso Direct Con 200 Lovibond yang dimiliki oleh Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM). Preparasi sample sesuai dengan sub bab 3.4.5 dengan ketentuan larutan 25ml untuk setiap konsentrasi. Tujuan pengujian DHL ini adalah untuk mengetahui seberapa besar nilai konduktivitas dari masing-masing larutan.

3.4. Fabrikasi Serat Nano PVA/Kitosan



Gambar 3.4. Diagram alir fabrikasi membran PVA/kitosan, uji tarik dan SEM

3.4.1. Proses Pembuatan Membran *Nanofiber*

Proses pembuatan membran PVA/Kitosan menggunakan alat electrospinning dengan seri HK-9 hasil rekayasa laboratorium Teknik Mesin Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY), proses pembuatannya sebagai berikut:

1. Menyiapkan *syringe* 10 ml dengan *needle* 0,6 mm (23 G).
2. Memasukan larutan PVA/Kitosan (90:10, 85:15, 80:20) (w/w) ke dalam *syringe*.

3. Lalu melapisi *needle* dengan aluminium foil dan memasukan *syringe* ke dalam elektrospinning.
4. Larutan difabrikasi selama 2 jam dengan jarak 16.5cm dan voltase 18 kV.
5. Setelah jadi, membran didiamkan selama 24 jam di dalam tempat vakum sebelum digunakan.

3.5. Instrumen Pengujian dan Analisis Sampel

3.5.1. Preparasi Sampel Pengujian Optik

Pengujian optik menggunakan *Optical Microscope* Teknik Mesin Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) dengan jenis Mikro dengan perbesaran 100x. Preparasi sampel menggunakan kaca preparat. Langkah pengujian sebagai berikut:

1. Membersihkan kaca preparat dengan alkohol.
2. Menempelkan kaca preparat pada plat kolektor, lalu running larutan selama 30 detik.
3. Melepas kaca preparat dan memindah ke alat *Optical Microscope* dan dilakukan pengamatan strukturnya.

3.5.2. Preparasi Sampel Pengujian Scanning Electron Microscope (SEM)

Pengujian ini menggunakan SEM Hitachi SU 3500 pada gambar 3.6 yang dimiliki Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan (BPTBA LIPI). Preparasi sampel pengujian SEM dibuat menggunakan elektrospinning selama 30 menit setiap variasinya. Setelah 30 menit, membran di ambil bagian tengahnya sebesar 1cm² tanpa dilepas aluminium foilnya. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui morfologi dan struktur serat membran nanofiber



Gambar 3.5. *scanning electron microscope (SEM) Hitachi SU 3500*

3.5.3. Preparasi Sampel Pengujian Tarik

Pengujian tarik menggunakan Universal Testing Machine Zwick 0.5 pada gambar 3.6 yang dimiliki Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada. Preparasi sample pengujian tarik menggunakan Frame dengan ASTM D882 seperti pada gambar 3.8, standar pengujian ini digunakan untuk membran dengan ketebalan kurang dari 1mm (0,040 in). Membran nanofiber dalam pengujian ini dibuat menggunakan electrospinning dengan lama 2 jam. Membran nanofiber dipotong dengan ukuran 2 x 1 cm.

Langkah pembuatan sepsimen uji:

1. Siapkan frame sesuai pada gambar 3.8 (A)
2. Siapkan membran nanofiber yang sudah dipotong dengan ukuran 2 x 1 cm.
3. Tempelkan membran pada frame sesuai pada gambar 3.8 (C)

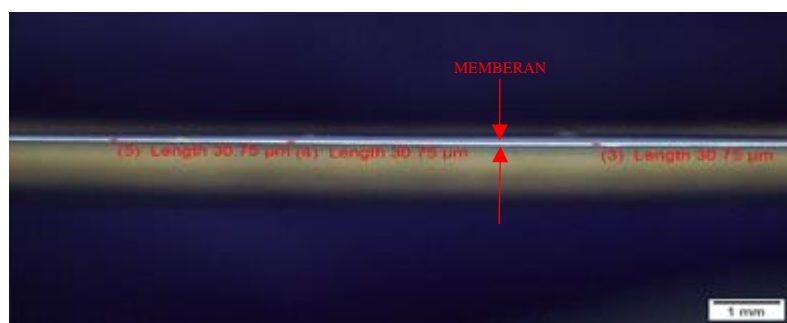
Setelah sample siap, ukur ketebalan spesimen menggunakan *Optical Microscope*.

Langkah mengukur ketebalann membran:

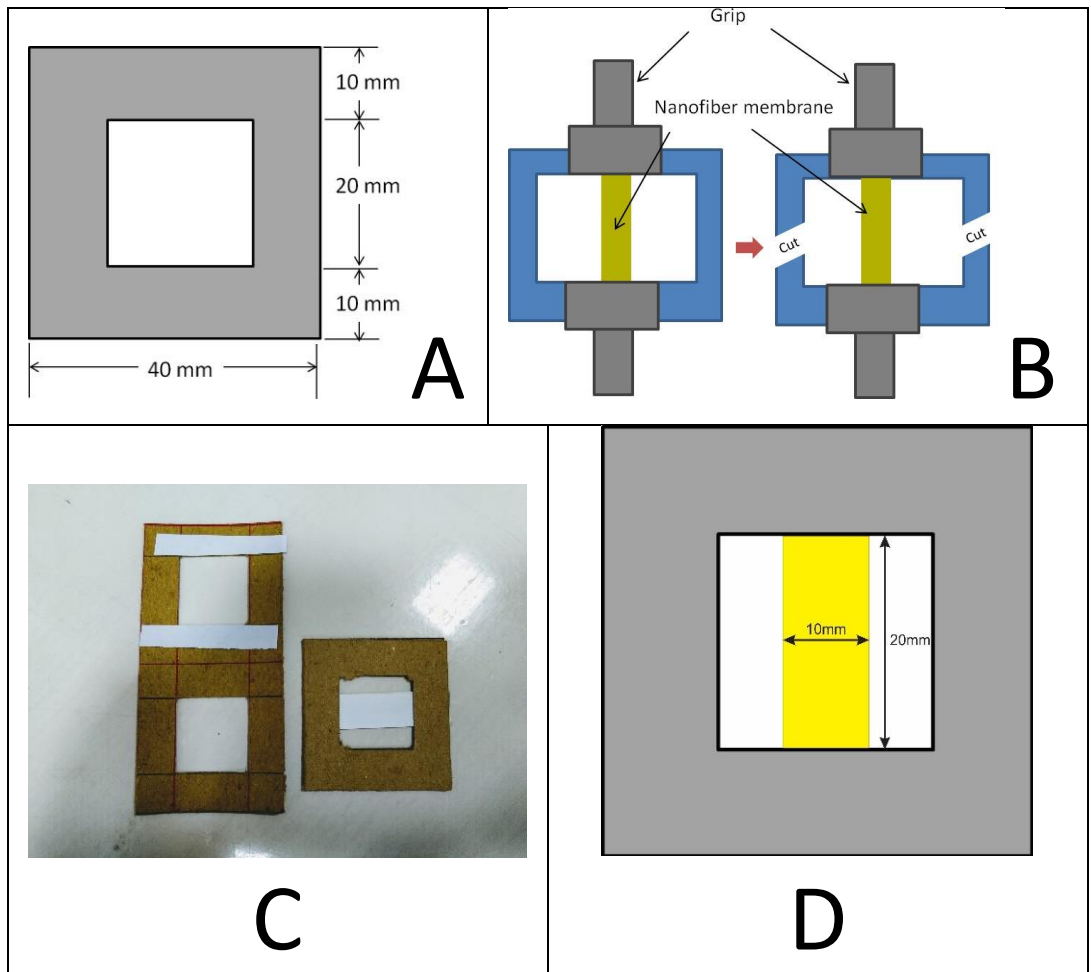
1. Frame bagian samping dipotong 1cm hingga membran terlihat.
2. Kemudian frame dijepit di atas meja optik menggunakan plastisin.
3. Atur *Optical Microscope* hingga membran terlihat dengan jelas.
4. Ukur ketebalah di 3 titik seperti pada gambar 3.7.
5. Lalu hitung rata-rata ketebalan.



Gambar 3.6. *Universal Testing Machine Zwick 0.5*

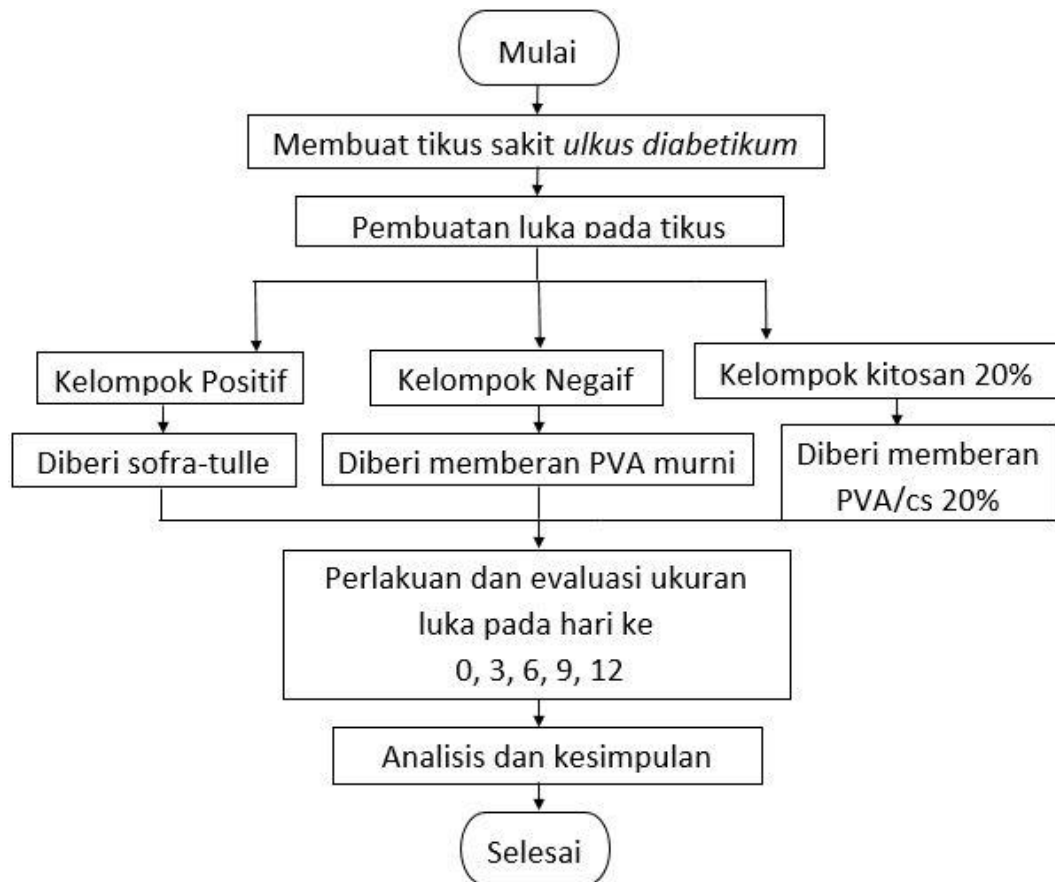


Gambar 3.7. Ketebalan membran



Gambar 3.8. (A) Frame dengan ASTM D882, (B) Posisi saat pengujian tarik, (C) Contoh sample, (D) Ukuran Membran di dalam frame.

3.6. Pengujian *In Vivo* pada Tikus Putih



Gambar 3.9. Diagram alir pengujian in vivo tikus putih

3.6.1. Persiapan Sampel Uji In Vivo

Sampel uji in vivo dibuat menggunakan electrospinning dengan ukuran 4×3 cm tiap sampel. Sampel akan diujikan pada luka Tikus selama ± 12 hari. Luka yang diberikan pada Tikus merupakan luka sayat terbuka pada tikus penderita ulkus diabetikum dengan ukuran diameter rata-rata 2cm. sebelumnya tikus disuntik dengan aloksan agar tikus menjadi sakit ulkus diabetikum. Pada pengujian in vivo ini, Tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok perlakuan yang menggunakan membran PVA/Cs 80:20 sebagai pembalut lukanya, kelompok kontrol negatif yang menggunakan membran PVA murni sebagai pembalut lukanya dan kelompok kontrol positif yang menggunakan sofratulle/kassa anti biotik.

Selama 3 hari sekali, pembalut luka akan diganti dan diamati sampai luka menutup. Proses penyembuhan luka dihitung dari selisih diameter akhir dengan diameter awal kemudian dikali 100%. Berikut ini merupakan langkah langkah yang dilakukan pada saat pengujian :

1. Tikus dimasukkan kedalam toples yang telah berisi kloroform selama ± 30 detik agar pingsan.
2. Kemudian tikus diberikan cetakan ukuran luka sayat yang akan dibuat.
3. Setelah itu tikus disayat menggunakan gunting bedah dengan ukuran (2cm).
4. Luka yang telah terbentuk dibersihkan menggunakan larutan fisiologis NaCl sebelum ditempel membran.
5. Ulangi semua langkah 1-4 untuk semua tikus kelompok 2 dan 3.
6. Setelah hari ke-3, tempelkan kembali membran pembalut luka pada Tikus.

3.7. Teknik Analisis

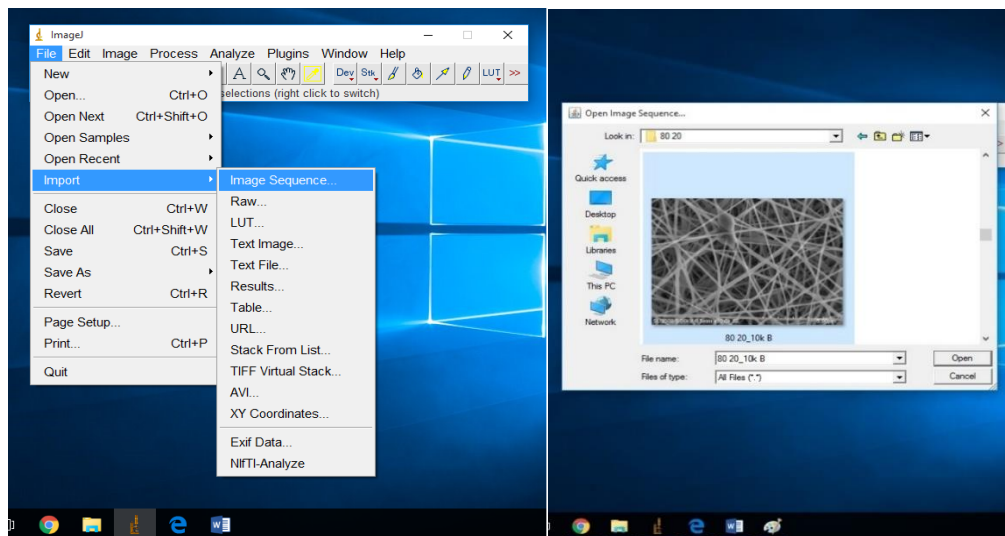
Pada penelitian ini ada tiga langkah analisis yang digunakan. Pertama menganalisis sifat fisis dari larutan yang akan digunakan untuk membuat membran, larutan dianalisis menggunakan konduktometer dan viscometer. Kedua menganalisis sifat mekanis (tegangan, regangan, dan modulus elastisitas) dari membran PVA/Cs berdasarkan hasil dari uji tarik. Selain menganalisis sifat mekanis, pada langkah ini juga dilakukan analisis sifat fisis membran nanofiber dengan perhitungan diameter dan distribusi serat. Langkah ketiga adalah menganalisis pengaruh membran nanofiber pada tikus putih untuk mengetahui pengaruhnya pada luka.

3.7.1. Karakterisasi morfologi membran nanofiber

Struktur morfologi permukaan membran PVA/Cs diamati menggunakan SEM. Diameter nanofiber diukur menggunakan *software* ImageJ pada 100 titik secara acak. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 10.000x dalam 2 spot. Dari hasil pengukuran 400 titik kemudian dihitung rata ratanya untuk dibandingkan dengan sampel yang lain.

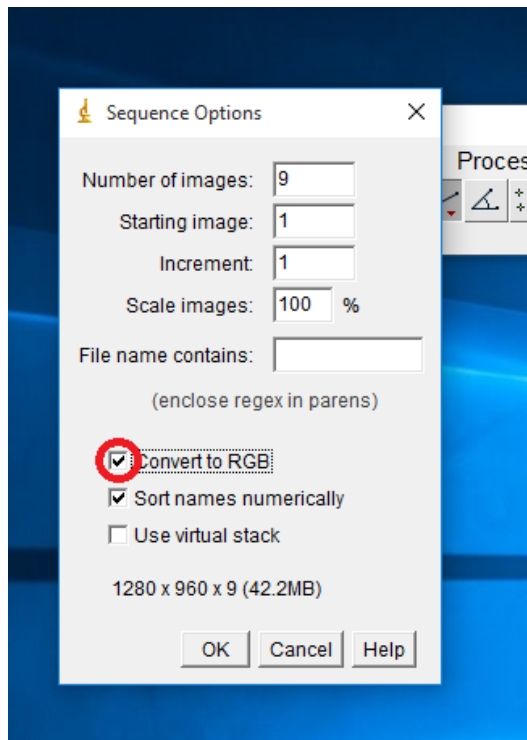
Langkah-langkah penggunaan *software ImageJ* :

1. Buka *software ImageJ*.
2. “Impor” hasil citra SEM yang akan di ukur diameternya (gambar 3.10)



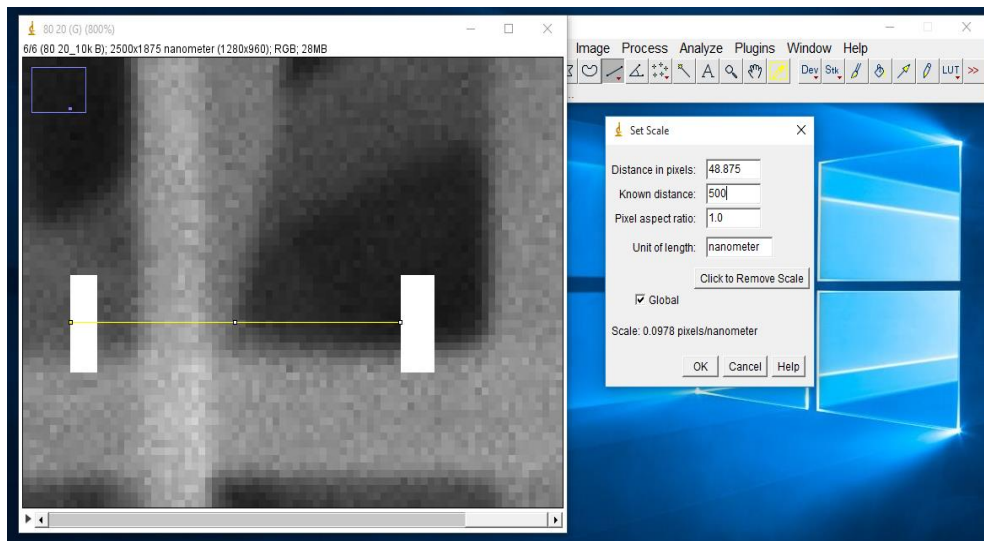
Gambar 3.10 Impor data hasil pengujian SEM

3. Centang kolom “Convert to RGB” selanjutnya klik “OK” pada panel “Sequence Options” (gambar 3.11)



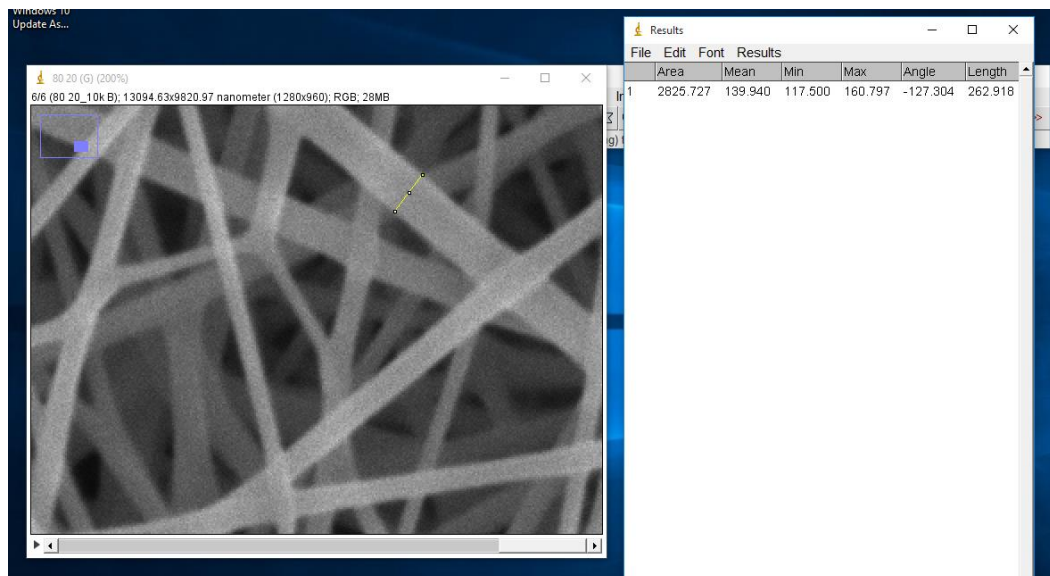
Gambar 3.11 Panel “Sequence Options”

4. “Set Scale” ukuran foto hasil citra SEM, kemudian isi kolom “known distance” dengan skala 500 nm setelah itu isi juga kolom “unit of length” dengan tulisan “nanometer”, lalu centang kolom bertuliskan “Global” dan klik “OK” (gambar 3.12)



Gambar 3.12 “Set Scale” ukuran foto hasil pengujian SEM

5. Melakukan pengukuran secara acak dengan menandai 100 titik yang berbeda pada foto hasil uji SEM (gambar 3.13) Tujuannya adalah untuk mendapatkan hasil diameter nanofiber yang detail pada setiap titiknya.



Gambar 3.13 Pengukuran diameter pada hasil pengujian SEM