BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen kuantitatif komparatif dengan membandingkan waktu respon, stabilitas, dan biodegradabilitas membran bioselulosa dan kertas bioselulosa sebagai *strip test* indikator asam basa berbasis bahan alam yang diimobilisasi dengan ekstrak bahan alam untuk pengujian keasamaan atau kebasaan suatu larutan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Januari-Februari 2025 di Laboratorium Analisis Makanan dan Minuman, Jurusan Analisis Farmasi dan Makanan, Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan adalah neraca analitik (Radwag), kaca arloji, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, pipet ukur 10 mL (Pyrex), gelas beaker 50 mL (Pyrex), gelas beaker 100 mL (Pyrex), gelas beaker 250 mL (Pyrex), labu takar 50 mL (Pyrex), labu takar 100 mL (Pyrex), erlenmeyer 250 mL (Pyrex), plat tetes, *hot plate*, *magnetic stirrer*, termometer, pH meter (Eutech), botol semprot, *blender*, oven, loyang tahan panas, *aluminium foil*, kertas saring Whatman, pisau, gunting, botol penyimpanan, wadah maserasi, aplikasi *Color Picker*.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah *Nata de coco*, NaOH (Merck), H_2O_2 3% (Onemed), HCl pekat, etanol 96%, asam asetat glasial (Smart-Lab), aquadest, tapioka, kaolin, bunga telang, bunga rosella, kulit buah naga, kulit manggis, kulit bawang merah, ubi jalar ungu, kayu secang, dan kunyit.

3.4 Variabel

3.4.1 Variabel *Dependent*

Pada penelitian ini variabel *dependent* adalah waktu respon, stabilitas, dan biodegradabilitas membran bioselulosa dan kertas selulosa sebagai *strip test* indikator asam basa dalam mengukur pH pada suatu larutan.

3.4.2 Variabel *Independent*

Pada penelitian ini variabel *independent* adalah media *strip test* indikator asam basa berupa membran bioselulosa dan kertas bioselulosa berbasis bahan alam.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Waktu respon	Waktu yang diperlukan oleh media *strip test* untuk menunjukkan perubahan warna setelah kontak dengan larutan asam dan basa	Waktu respon diukur menggunakan *stopwatch*	Waktu respon dengan satuan detik	Rasio
Stabilitas	Stabilitas dilakukan untuk menilai kemampuan media *strip test* dalam mempertahankan kestabilan warna selama waktu simpan 30 hari	Stabilitas diukur RGB (*Red, Green, Blue*) menggunakan aplikasi *Color Picker*	Nilai RSD dari nilai intensitas RGB pada uji stabilitas	Rasio
Biodegradabilitas	Biodegradabilitas dilakukan untuk menilai kemampuan media *strip test* terurai di dalam tanah selama 30 hari	Biodegradabilitas diukur dengan persen degradasi	Grafik biodegradabilitas dari persen degradasi	Rasio

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Media *strip test* indikator asam basa	Media berbasis bahan alam (*Nata de coco*) berupa membran dan kertas bioselulosa	Pengamatan perubahan warna	Perubahan warna yang terjadi pada media *strip test* indikator asam basa	Nominal

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Membran Bioselulosa

Nata de coco direndam dengan NaOH 2% selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian, *nata de coco* direndam dengan asam asetat 2% selama 24 jam. Selanjutnya, *nata de coco* dicuci menggunakan air hingga pH netral (Lindu *et al*., 2010). *Nata de coco* dipotong tipis-tipis menggunakan alat pemotong, dan potongan *nata de coco* ditempatkan di atas loyang tahan panas. Kemudian, potongan *nata de coco* dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60-70°C hingga kering. Setelah kering, membran bioselulosa yang dihasilkan diambil dan disimpan untuk selanjutnya dilakukan proses imobilisasi dengan ekstrak bahan alam.

3.6.2 Pembuatan Kertas Bioselulosa

Sebanyak 300 gram *nata de coco* dipurifikasi dengan cara dimasak dalam 100 mL NaOH 1% dan 100 mL H_2O_2 2% pada suhu 60-70°C selama 20 menit. *Nata de coco* yang telah dimasak dinetralkan menggunakan air hingga mencapai pH netral. Setelah itu, *nata de coco* yang telah netral dihaluskan menggunakan *blender* hingga diperoleh tekstur yang lembut. *Nata de coco* yang telah halus kemudian ditambahkan dengan tapioka 2,5% dan kaolin 5%, dipanaskan pada suhu 60°C selama 10 menit, dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. *Pulp* dituangkan ke dalam cetakan kertas dan dikeringkan di bawah sinar matahari (Khairunnisa *et al*., 2021). Setelah kering, kertas bioselulosa yang dihasilkan diambil dan disimpan untuk selanjutnya dilakukan proses imobilisasi dengan ekstrak bahan alam.

3.6.3 Pembuatan Ekstrak Bahan Alam

Sampel bahan alam yang digunakan disortasi dalam kondisi basah maupun kering. Sampel bahan alam yang telah disortasi dikeringkan menggunakan oven pada suhu 45°C. Setelah itu, sampel bahan alam yang telah kering dihaluskan

menggunakan *grinder* dan ditimbang sebanyak 25 gram. Sampel bahan alam dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan dimaserasi menggunakan 100 mL pelarut etanol 96% dengan perbandingan rasio bahan dan pelarut 1:4 (Wasito *et al*., 2017). Pada ubi jalar ungu, preparasi dilakukan dengan merebus hingga matang ubi jalar ungu yang telah dicuci bersih. Ubi jalar ungu kemudian ditimbang 25 gram dan dihaluskan. Selanjutnya, ubi jalar ungu dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan dimaserasi menggunakan 100 mL pelarut etanol 96% dengan perbandingan rasio bahan dan pelarut 1:4. Proses maserasi dilakukan pada suhu kamar selama 24 jam di dalam wadah maserasi yang dilapisi aluminium foil untuk mencegah degradasi senyawa yang diekstraksi (Armanzah dan Hendrawati, 2016). Setelah proses maserasi selesai, larutan ekstraksi disaring menggunakan kertas saring Whatman untuk memisahkan residu dan filtrat. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk imobilisasi pada media *strip test* indikator asam basa. Prosedur ini dilakukan juga pada 7 jenis bahan alam lain berupa bunga telang, bunga rosella, kulit buah naga, kulit manggis, kulit bawang merah, kayu secang, dan kunyit.

3.6.4 Proses Imobilisasi *Strip Test* Indikator Asam Basa

Media berupa membran bioselulosa dan kertas bioselulosa dengan ukuran 1 x 4 cm direndam ke dalam setiap larutan 8 ekstrak bahan alam selama 12 jam. Setelah proses perendaman selesai, membran bioselulosa ditempelkan pada kertas perkamen dan dikeringkan pada suhu ruang hingga kering. Sebaliknya, kertas bioselulosa langsung dikeringkan pada suhu ruang hingga kering. *Strip test* yang telah kering disimpan di dalam botol berisi *silica gel*.

3.6.5 Pembuatan Larutan Asam dan Basa

Larutan asam dibuat dengan mengencerkan 1 mL HCl pekat menggunakan aquadest di dalam labu ukur 100 mL. Kemudian, larutan basa dibuat dengan melarutkan 1 g NaOH menggunakan aquadest di dalam labu ukur 100 mL.

3.6.6 Uji Mutu *Strip Test* Indikator Asam Basa

3.6.6.1 Uji Pendahuluan

Strip test indikator asam basa berupa membran bioselulosa dan kertas bioselulosa yang diimobilisasi dengan 8 ekstrak bahan alam kemudian dicelupkan

ke dalam larutan asam dan basa. Perubahan warna yang terjadi pada uji pendahuluan dicatat.

3.6.6.2 Uji Waktu Respon

Strip test indikator asam basa berupa membran bioselulosa dan kertas bioselulosa yang diimobilisasi dengan ekstrak bahan alam kemudian dicelupkan ke dalam larutan asam dan basa. Waktu respon *strip test* dicatat ketika terjadi perubahan warna *strip test* membran bioselulosa dan kertas bioselulosa. Pencatatan waktu respon dilakukan dengan menggunakan *stopwatch*. *Strip test* (membran selulosa dan kertas bioselulosa) yang diimobilisasi dengan ekstrak bahan alam dengan waktu respon tercepat serta perubahan warna yang baik digunakan untuk pengujian tahap selanjutnya.

3.6.6.3 Uji Stabilitas

Strip test (membran selulosa dan kertas bioselulosa) yang diimobilisasi dengan ekstrak bahan alam dengan waktu respon tercepat serta perubahan warna yang baik disimpan selama 30 hari. Pengujian *strip test* dilakukan pada larutan asam dan basa setiap hari dengan pengukuran nilai intensitas RGB menggunakan aplikasi *Color Picker*.

3.6.6.4 Uji Biodegradabilitas

Strip test (membran selulosa dan kertas bioselulosa) ditanam di dalam tanah selama 30 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan ditimbang massa membran bioselulosa dan kertas bioselulosa untuk memantau perubahan yang terjadi pada 2 replikasi strip selama masa uji. Persentase degradasi *strip test* dihitung menggunakan rumus persen degradasi dapat dilihat pada Rumus 3.1. Hasil perhitungan persen degradasi dicatat untuk analisis biodegradabilitas *strip test* (Parhan *et al*., 2024).

3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan berdasarkan hasil pengujian terhadap empat parameter utama, yaitu pendahuluan, waktu respon, stabilitas, dan biodegradabilitas dari membran bioselulosa dan kertas bioselulosa yang telah diimobilisasi ekstrak bahan alam.

3.7.1.1 Uji Pendahuluan

Pendahuluan dicatat terjadinya perubahan warna yang diperoleh dari pengujian membran bioselulosa dan kertas bioselulosa pada larutan asam basa.

3.7.1.2 Uji Waktu Respon

Waktu respon diukur menggunakan *stopwatch* dengan satuan detik. Kemudian data dicatat dan dihitung nilai rata-rata (*mean*) dari waktu yang dibutuhkan *strip test* untuk menunjukkan perubahan warna pada larutan asam dan basa.

3.7.1.3 Uji Stabilitas

Stabilitas warna dianalisis dengan aplikasi *Color Picker* untuk memperoleh nilai intensitas warna yaitu RGB (*Red*, *Green*, *Blue*). Nilai intensitas RGB yang diperoleh dari setiap pengamatan dihitung nilai *mean*, kemudian dihitung simpangan baku (SD) dan *relative standard deviation* (RSD) untuk menilai kestabilan warna selama penyimpanan. Nilai RSD dari larutan asam dan larutan basa dihitung rata-rata pada masing-masing media *strip test*. Pengolahan data *mean*, SD, dan RSD dilakukan menggunakan *Microsoft Excel*.

3.7.1.4 Uji Biodegradabilitas

Biodegradabilitas diukur dengan dihitung persen degradasi media *strip test* selama periode waktu tertentu, berdasarkan perubahan berat media membran bioselulosa dan kertas bioselulosa, menggunakan persamaan persen degradasi dapat dilihat pada Rumus 3.1. Data kemudian dirata-ratakan untuk memperoleh nilai rata-rata persen degradasi pada masing-masing jenis media.

Perhitungan uji biodegradabilitas:

$$\text{Persen degradasi} = \frac{\mathbf{W_0 - W_1}}{\mathbf{W_0}} \mathbf{x\ 100}\% \quad \text{..... (3. 1)}$$

Keterangan:

W_0 = Berat *strip test* awal (g)

W_1 = Berat *strip test* akhir (g)

3.7.2 Penyajian Data

Data hasil pengolahan disajikan secara sistematis dalam bentuk tabel dan grafik untuk mempermudah interpretasi dan perbandingan antar media membran bioselulosa dan kertas bioselulosa.

3.7.2.1 Uji Pendahuluan

Tabel 3. 2 Uji pendahuluan membran dan kertas bioselulosa

Uji Pendahuluan			
Ekstrak	**Literatur Warna**	**Perubahan Warna**	
		Larutan Asam	**Larutan Basa**
Bunga Telang			
Bunga Rosella			
Kulit Buah Naga			
Kulit Manggis			
Kulit Bawang Merah			
Ubi Jalar Ungu			
Kayu Secang			
Kunyit			

3.7.2.2 Uji Waktu Respon

Tabel 3. 3 Uji waktu respon membran dan kertas bioselulosa

Waktu Respon (Detik)						
Ekstrak	**Asam**			**Basa**		
	Replikasi 1	**Replikasi 2**	**Rata-rata**	**Replikasi 1**	**Replikasi 2**	**Rata-rata**
Bunga telang						
Bunga rosella						
Kulit manggis						
Kulit Kulit Bawang merah						
Ubi jalar ungu						
Kayu secang						
Kunyit						

Tabel 3. 4 Rata-rata waktu respon

Waktu Respon (Detik)			
Ekstrak	**Asam**	**Basa**	**Rata-rata**
Bunga telang			
Bunga rosella			
Kulit buah naga			
Kulit manggis			
Kulit Bawang merah			
Ubi jalar ungu			
Kayu secang			
Kunyit			

3.7.2.3 Uji Stabilitas

Tabel 3. 5 Data nilai intensitas RGB uji stabilitas

Stabilitas (RGB) 30 Hari												
Hari ke-	Membran Bioselulosa						Kertas Bioselulosa					
	Larutan Asam			Larutan Basa			Larutan Asam			Larutan Basa		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B	R	G	B
1												
2												
3												
...												
30												
Mean												
SD												
RSD												
Rata-rata RSD												

3.7.2.4 Uji Biodegradabilitas

Tabel 3. 6 Data uji biodegradabilitas membran dan kertas bioselulosa

Uji Biodegradabilitas (30 Hari)				
Hari Ke-	Membran Bioselulosa		Kertas Bioselulosa	
	Massa Membran	Persen Degradasi (%)	Massa Kertas	Persen Degradasi (%)
1				
2				
3				
...				
30				
Rata-rata				

3.7.3 Analisis Data

3.7.3.1 Uji Pendahuluan

Perubahan warna yang dihasilkan oleh ekstrak bahan alam pada uji pendahuluan (asam basa) setelah penambahan masing-masing larutan HCl dan larutan NaOH diamati dan dicatat secara cermat. Warna hasil uji kemudian dibandingkan dengan perubahan warna berdasarkan literatur perubahan warna ekstrak bahan alam pada kondisi asam dan basa. Analisis ini bertujuan untuk mengevaluasi apakah ekstrak bahan alam memiliki potensi sebagai indikator pH alami dengan memastikan bahwa perubahan warna yang dihasilkan sesuai dengan

karakteristik senyawa pigmen alami. serta kesesuaian hasil pengamatan dengan literatur.

3.7.3.2 Uji Waktu Respon

Uji waktu respon dianalisis dengan membandingkan lama waktu yang dibutuhkan oleh membran bioselulosa dan kertas bioselulosa yang telah diimobilisasi dengan delapan jenis ekstrak bahan alam untuk menunjukkan perubahan warna yang jelas setelah kontak dengan larutan penguji. Hasil waktu respon dari masing-masing ekstrak pada kedua media, kemudian dianalisis untuk menentukan ekstrak mana yang memberikan respon tercepat. Analisis komparatif dilakukan dengan menggunakan rata-rata waktu respon antara kedua media *strip test* indikator pH yakni membran bioselulosa dan kertas bioselulosa untuk membandingkan kecepatan perubahan warna antara membran bioselulosa dan kertas bioselulosa dalam mendeteksi asam dan basa.

3.7.3.3 Uji Stabilitas

Uji stabilitas dianalisis dengan membandingkan nilai intensitas RGB yang diperoleh dari hasil dokumentasi visual terhadap perubahan warna strip indikator pH selama periode penyimpanan selama 30 hari. Perbandingan antara kedua jenis media *strip test* indikator pH yakni membran bioselulosa dan kertas bioselulosa menjadi identifikasi media yang lebih stabil dalam mempertahankan konsistensi performa indikator pH selama masa penyimpanan penggunaan nilai intensitas RGB disesuaikan dengan intensitas warna pada media *strip test* indikator asam basa. Semakin kecil komposisi nilai G (*Green*) dan B (*Blue*), maka nilai R (*Red*) akan semakin besar yang mengindikasikan intensitas warna merah yang semakin kuat (cerah). Sebaliknya, jika komposisi nilai R rendah, maka nilai G dan B semakin tinggi, ditandai dengan intensitas warna merah yang lemah, di mana warna yang dihasilkan akan cenderung pucat (Riansyah *et al*., 2021). Nilai intensitas RGB tersebut, kemudian dihitung nilai SD dan RSD untuk menilai sejauh mana kestabilan warna indikator selama waktu penyimpanan. RSD yang lebih kecil menunjukkan kestabilan warna yang lebih baik.

3.7.3.4 Uji Biodegradabilitas

Uji biodegradabilitas dianalisis dengan pengamatan perubahan massa antara kedua jenis media *strip test* indikator pH yakni membran bioselulosa dan

kertas bioselulosa setiap hari selama 30 hari dengan *duplo* (penggunaan 2 *strip test*). Persen degradasi didapatkan dari perhitungan dari massa sebelum dan setelah biodegradabilitas, dan dibandingkan antara membran bioselulosa dengan kertas bioselulosa yang memiliki tingkat biodegradabilitas lebih tinggi. Semakin tinggi persentase biodegradabilitas, maka semakin baik kemampuan media untuk terurai di lingkungan secara alami. Analisis dilakukan dengan membandingkan rata-rata persen degradasi antar media untuk menilai kecepatan degradasi di lingkungan.