

## BAB III

### METODE PENELITIAN

Dalam melakukan kegiatan penelitian diperlukan peralatan laboratorium, bahan serta prosedur penelitian yang akan dilakukan. Tiga hal tersebut dapat diuraikan sebagai berikut:

#### 3.1 Alat Dan Bahan

##### 3.1.1 Alat

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu set alat destilasi, neraca digital 4 digit, tabung maserasi, termometer, corong *Buchner*, labu Erlenmeyer berpenghisap, batang pengaduk, gelas ukur, gelas kimia, *rotary vaccum evaporator*, pipet mikro, box sterofom, lumpang-alu dan beberapa peralatan gelas lain. Sementara alat yang digunakan untuk keperluan analisis adalah *water bath*, pH meter *Uchida*, *ependorf microcentrifuge tube*, serta spektrofotometer UV/Vis *Shimadzu 1240* yang berada di Jurusan Pendidikan Kimia.

##### 3.1.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk (nangka),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (natriumdihidrogenfosfat) dan  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (asam sitrat) untuk pembuatan larutan buffer fosfat 0,1M dengan pH 6,5, L-Tirosin 0,03%, larutan Tirosinase, dimetilsulfoksida (DMSO), asam klorida pekat, serbuk magnesium dan beberapa

pelarut yang diperlukan adalah metanol, air serta campuran air dan asam asetat dengan berbagai variasi konsentrasi (9:1; 8:2; 7:3).

### 3.2 Metode Penelitian

Pada metode penelitian ini terdapat tahapan untuk melakukan penelitian, berikut ini merupakan tahapannya:

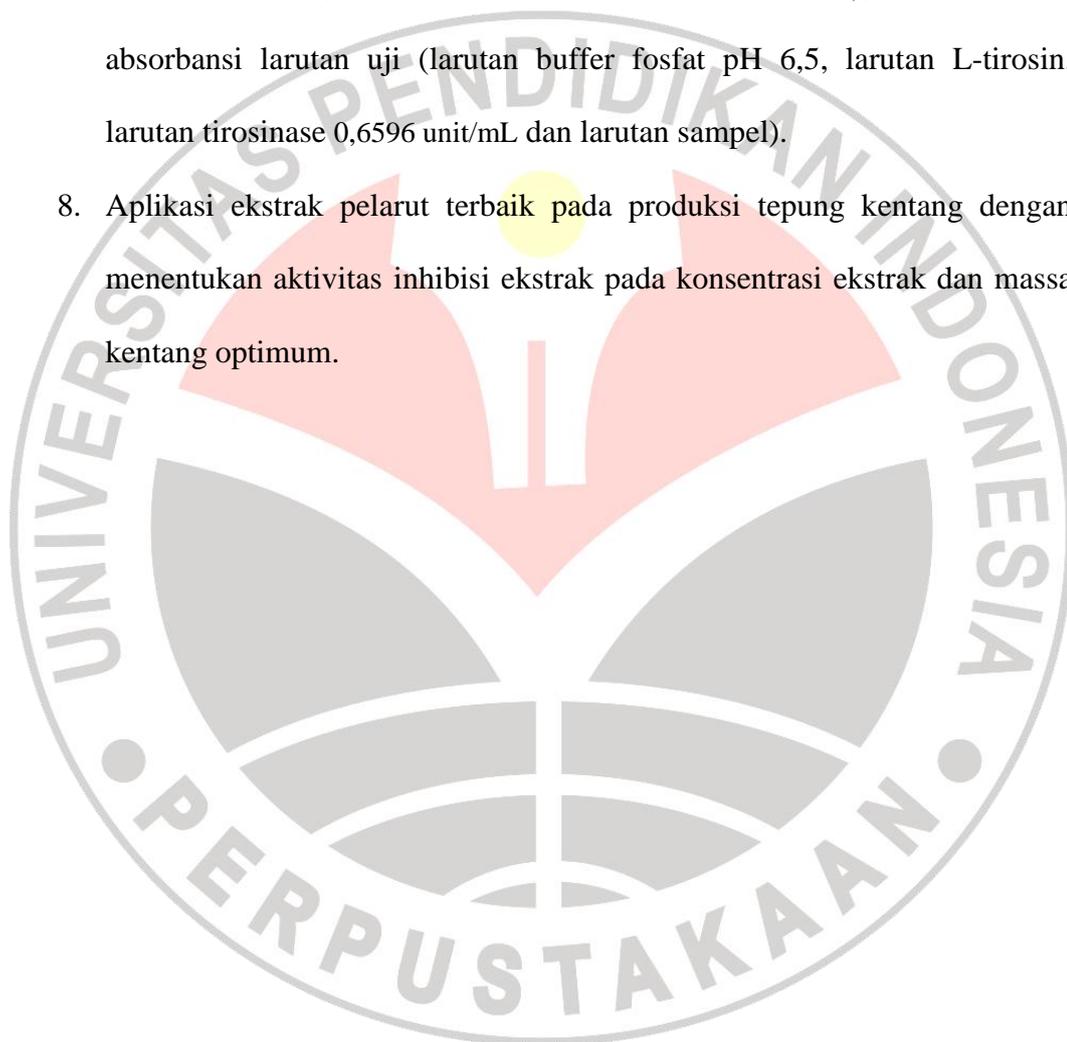
1. Pengambilan sampel *Artocarpus heterophyllus* Lamk di daerah Sumedang, Jawa Barat.
2. Sampel *Artocarpus heterophyllus* Lamk dideterminasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB.
3. Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk dikeringkan pada suhu kamar.
4. Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk digiling hingga menjadi serbuk, yang dilakukan di Balai Pulp dan Kertas.
5. Ekstraksi terhadap semua zat yang terdapat di dalam serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk dengan cara maserasi dengan pelarut H<sub>2</sub>O dan campuran H<sub>2</sub>O dengan CH<sub>3</sub>COOH dalam berbagai variasi.
6. Penentuan daya inhibisi yang paling optimal diantara pelarut ekstraksi terhadap kinerja reaksi enzimatik tirosin-tirosinase.
7. Analisis kinerja inhibisi masing-masing ekstrak. Kinerja inhibisi diukur melalui absorbansi larutan sampel menggunakan Spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang sinar tampak (475 nm).

Absorbansi yang terukur diubah menjadi presentasi aktivitas inhibisi tirosinase berdasarkan Chang *et al.* (2005) dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi Tirosinase} = [(A - B) / A] \times 100$$

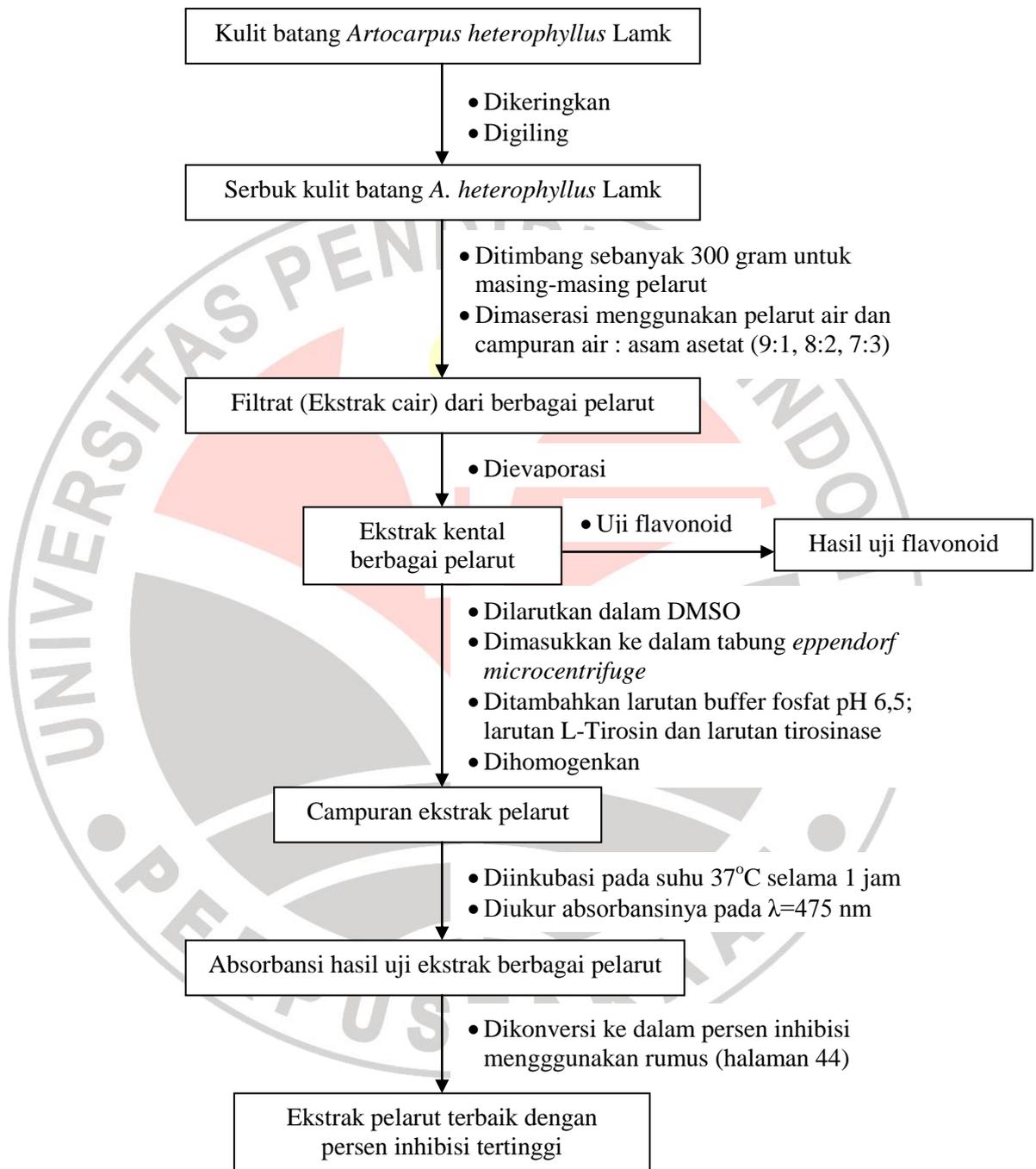
A adalah Absorbansi larutan kontrol positif (larutan buffer fosfat pH 6,5, larutan L-tirosin, dan larutan tirosinase 0,6596 unit/mL), dan B adalah absorbansi larutan uji (larutan buffer fosfat pH 6,5, larutan L-tirosin, larutan tirosinase 0,6596 unit/mL dan larutan sampel).

8. Aplikasi ekstrak pelarut terbaik pada produksi tepung kentang dengan menentukan aktivitas inhibisi ekstrak pada konsentrasi ekstrak dan massa kentang optimum.



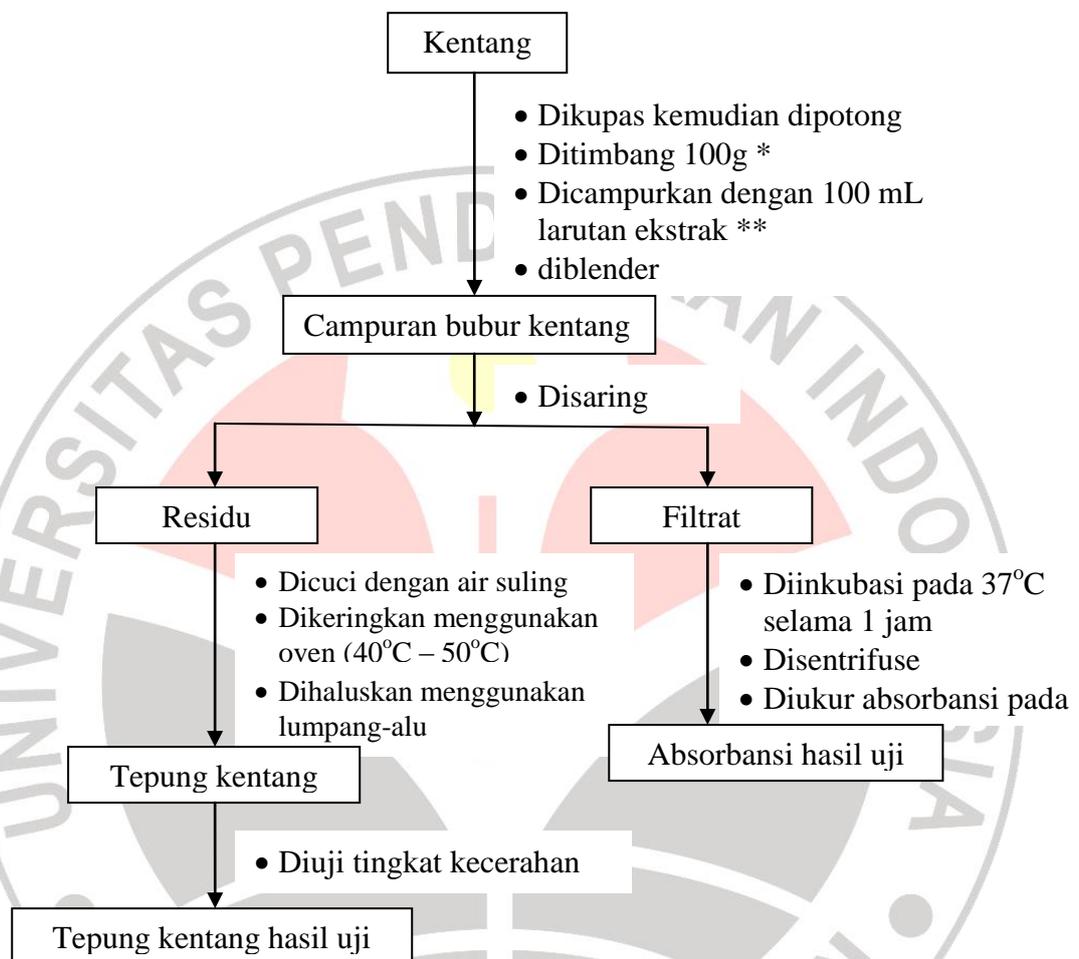
### 3.3 Bagan Alir Penelitian

#### 3.3.1 Penentuan pelarut terbaik pengestrak inhibitor tirosinase.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penentuan Pelarut Terbaik

3.3.2 Penentuan aktivitas inhibisi tirosinase pada aplikasi pembuatan tepung kentang dan uji tingkat kecerahan tepung kentang.



Gambar 3.2 Diagram Alir Proses Pembuatan Tepung Kentang serta Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase dan Tingkat Kecerahan Tepung

Keterangan : Bagan alir di atas berlaku untuk \*\*variasi konsentrasi ekstrak (0,03 %; 0,04 %; 0,05 %; 0,06 %; 0,07 %; 0,08 %; 0,09 % dan 0,10 %), dan \*variasi massa kentang (50 g; 100 g; 150 g; 200 g; 250 g).

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Penyiapan sampel

Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk (nangka) diambil dari daerah Sumedang yang kemudian dideterminasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB untuk menentukan spesies tanaman tersebut. Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk (nangka) yang akan digunakan sebagai sampel dibersihkan terlebih dahulu dari lumut dan dikeringkan pada suhu kamar selama  $\pm 1$  bulan. Sampel yang telah kering dibersihkan kembali dari debu kemudian dipotong-potong menjadi bagian kecil dan digiling hingga berbentuk serbuk halus. Proses penggilingan dilakukan di Balai Besar Pulp dan Kertas, Bandung.

#### 3.4.2 Proses ekstraksi

Serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk (nangka) ditimbang sebanyak 1,5 kg kemudian diekstraksi dengan metode maserasi yang dilakukan selama 2 x 24 jam dengan menggunakan pelarut metanol, air, campuran air dan asam asetat dengan komposisi (9:1) ; (8:2) ; (7:3). Pada proses maserasi digunakan sebanyak 2 x 2 L untuk masing-masing pelarut. Ekstrak cair yang diperoleh dari hasil maserasi disaring menggunakan corong buchner, sehingga filtrat dan residu terpisah. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan rotary vaccum evaporator untuk menghasilkan ekstrak kental dari kelima pelarut yaitu metanol, air, campuran air dan asam asetat (9:1) ; (8:2) ; (7:3).

### 3.4.3 Pengujian aktivitas inhibisi tirosinase

Tahap pengujian ini dilakukan dengan metode Miyazawa dan Naotaka Tamura (2007), yang telah dimodifikasi. Preparasi yang dilakukan sebelum tahap pengujian yaitu pembuatan larutan ekstrak sampel 100 ppm. Ekstrak kental dari masing-masing pelarut ditimbang sebanyak 0,0010 gram dan dilarutkan dalam 10 mL larutan DMSO. Pada pengujian ini digunakan beberapa *ependorf microcentrifuge tube* yang berisi campuran dengan komposisi sebagai berikut:

- 1) Blanko : 760  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat 0,1M (pH=6,5), 40  $\mu\text{L}$  DMSO, dan 200  $\mu\text{L}$  akuades.
- 2) Kontrol : 660  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat 0,1M (pH=6,5), 40  $\mu\text{L}$  DMSO, 200  $\mu\text{L}$  L-Tirosin, dan 100  $\mu\text{L}$  larutan tirosinase.
- 3) Sampel : 660  $\mu\text{L}$  larutan buffer fosfat 0,1M (pH=6,5), 40  $\mu\text{L}$  larutan ekstrak sampel, 200  $\mu\text{L}$  L-tirosin, dan 100  $\mu\text{L}$  larutan tirosinase.

Untuk *ependorf microcentrifuge tube* yang berisi campuran kontrol dan sampel, tahapan komposisi yang harus dilakukan yaitu larutan buffer fosfat 0,1M (pH=6,5), larutan ekstrak sampel dalam DMSO, dan larutan L-tirosin dimasukkan ke dalam *ependorf microcentrifuge tube*, begitupun dengan larutan tirosinase dalam keadaan terpisah, kemudian diinkubasi awal selama 15 menit, setelah itu dihomogenkan ke dalam larutan tirosinase dan dilakukan inkubasi kembali selama 1 jam pada suhu yang sama yaitu 37°C. Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 475 nm.

Dari data absorbansi yang diperoleh dapat diketahui persen inhibisinya menurut, Chang *et al.*, 2005 dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = [(A - B) / A] \times 100 \%$$

Ket. : A adalah absorbansi larutan tanpa sampel (larutan buffer fosfat 0,1 M, larutan L- tirosin, DMSO dan larutan tirosinase) dan B adalah absorbansi dengan penambahan sampel (larutan buffer fosfat 0,1M, larutan sampel dalam DMSO, larutan L- tirosin, dan larutan tirosinase).

#### 3.4.4 Uji senyawa flavonoid secara kualitatif

Ekstrak kental dari masing-masing pelarut dilarutkan dalam 1 mL pelarutnya, kemudian ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat. Jika larutan menghasilkan warna kuning menunjukkan adanya flavonoid di dalam ekstrak sampel (Markham, 1988).

#### 3.4.5 Aplikasi ekstrak terbaik terhadap pembuatan tepung kentang

Pengujian aktivitas inhibisi tirosinase pada masing-masing ekstrak diperoleh ekstrak dengan persen inhibisi tertinggi yaitu ekstrak terbaik sebagai inhibitor tirosinase. Ekstrak terbaik tersebut diaplikasikan terhadap pembuatan tepung kentang. Pada proses pembuatan tepung kentang ini akan dilakukan pengujian aktivitas inhibisi tirosinase dan tingkat kecerahan tepung pada :

##### 1. Variasi Konsentrasi Ekstrak

Cara kerja yang dilakukan pada pembuatan tepung kentang dengan variasi konsentrasi ekstrak, hampir sama dengan bagan alir pembuatan tepung kentang namun konsentrasi larutan ekstrak yang dibuat bervariasi (0,03%; 0,04%; 0,05%; 0,06%; 0,07%; 0,08%; 0,09% dan 0,10%). Filtrat pada masing-

masing konsentrasi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis ( $\lambda = 475 \text{ nm}$ ), kemudian diperoleh hasil pengujian aktivitas inhibisi tirosinase. Residunya dikeringkan dan dihaluskan, sehingga diperoleh tepung kentang. Tepung tersebut diuji tingkat kecerahannya.

## 2. Variasi Massa Kentang

Seperti variasi konsentrasi ekstrak, pengujian aktivitas inhibisi tirosinase dan tingkat kecerahan tepung kentang, dilakukan dengan cara kerja yang hampir sama. Perbedaannya yaitu pada massa kentang yang digunakan bervariasi (50 g, 100 g, 150 g, 200 g, 250 g), sedangkan konsentrasi larutan ekstrak yang digunakan adalah konsentrasi larutan ekstrak optimum.

