

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan**

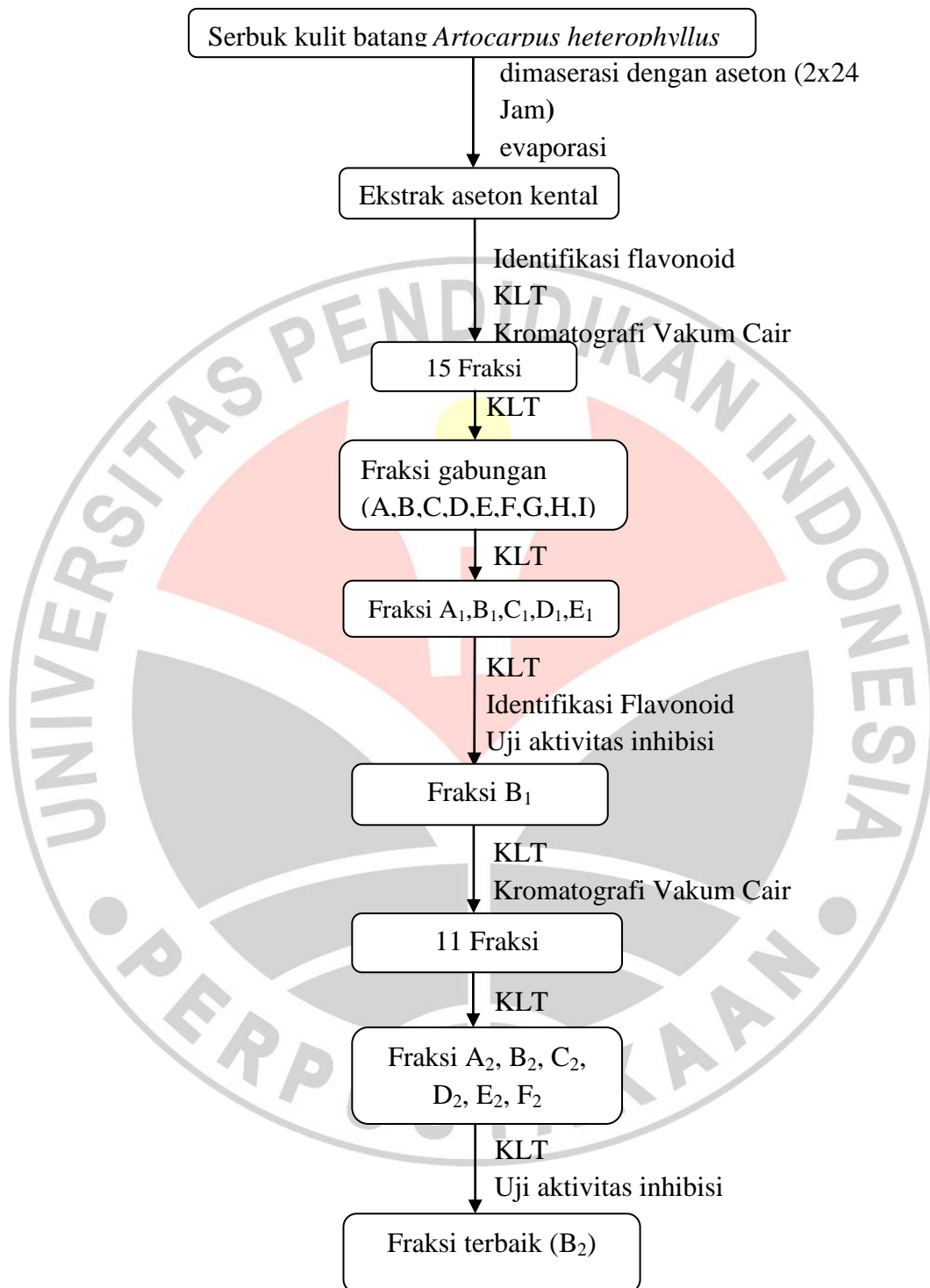
##### **3.1.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya: set alat destilasi, tabung maserasi, *rotary vaccum evaporator* Sibata *Olibath* B-485, termometer, pipet mikro, neraca analitik 3 digit (HF 300 AND) dan 4 digit (*Adventure Dhaus*), box sterofom, corong *Buchner*, *Chamber*, set alat kromatografi vakum cair, serta beberapa peralatan gelas. Selain itu digunakan pula alat untuk keperluan analisis yang meliputi; pH meter *Uchida*, *eppendorf microcentrifuge tube*, *water bath*, lampu ultraviolet, dan spektrofotometer UV/VIS *Shimadzu* 1240.

##### **3.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu kulit batang *Artocarpus heterophyllus* (nangka), Kieselgel 60 GF<sub>254</sub>, larutan buffer fosfat 0,1 M dengan pH 6,5, L-tirosin 0,03%, larutan tirosinase 0,1 M, serbuk magnesium p.a, asam klorida pekat p.a, silika gel Merck 60 (60-70 mesh), silika gel Merck 60 G (63–200 µm), dimetilsulfoksida (DMSO), heksan, etil asetat, aseton, diklorometan, metanol dan aquades.

### 3.2 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian fraksinasi ekstrak aseton kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk.

### 3.3 Metode Penelitian

Tahap – tahap penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

Tahap pertama: Determinasi Tanaman *Artocarpus heterophyllus* di SITH ITB Bandung.

Tahap kedua : Penggilingan sampel di Balai Besar Pulp dan Kertas.

Tahap ketiga : Maserasi serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* dengan aseton (2 x 12 Liter) dan kemudian diuapkan.

Tahap keempat : Pengujian flavonoid, KLT (heksan 100%, heksan : etil asetat 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, dan 100% etil asetat), KVC (heksan : etil asetat 8:2 dilakukan sebanyak 4 kali, 7:3 dilakukan sebanyak 4 kali, 4:6 dilakukan sebanyak 3 kali, 2:8 dilakukan sebanyak 2 kali, etil asetat 100% dilakukan sebanyak 2 kali.

Tahap kelima : kromatografi lempeng tipis (KLT) heksan : etil asetat 3 :7.

Tahap keenam : kromatografi lempeng tipis (KLT) heksan : etil asetat. 7:3 dan diklorometan : metanol 9:1.

Tahap ketujuh : kromatografi lempeng tipis (KLT) diklorometan : metanol 9:1, identifikasi fitokimia, dan uji inhibisi.

Tahap kedelapan : kromatografi lempeng tipis (KLT) heksan 100%, heksan : etil asetat 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, kromatografi vakum cair (KVC) heksan : etil asetat 9:1 dilakukan sebanyak 2 kali, 8:2 dilakukan sebanyak 4 kali, 7:3 dilakukan sebanyak 3 kali, 1:1 dilakukan

sebanyak 1 kali, dan 100% etil asetat dilakukan sebanyak 1 kali.

Tahap kesembilan : kromatografi lempeng tipis (KLT) heksan : etil asetat 8:2.

Tahap kesepuluh : kromatografi lempeng tipis (KLT) heksan : etil asetat 8:2, dan 7:3, dan uji inhibisi.

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Preparasi Sampel**

Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* diperoleh dari daerah Cimareme Kab.Bandung yang kemudian dilakukan determinasi di Sekolah Ilmu Tinggi Hayati (SITH) ITB Bandung untuk menentukan spesies tanaman.

Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* yang telah dibersihkan dari sisa – sisa kotorannya selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar (25°C) selama satu bulan. Kemudian dilakukan penggilingan agar menjadi serbuk. Proses penggilingan dilakukan di Balai Pulp dan Kertas, Bandung.

#### **3.4.2 Proses Ekstraksi**

Serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* ditimbang sebanyak 3 Kg, selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi (direndam) selama 2x24 jam dengan menggunakan pelarut aseton (2x12 L). Ekstrak aseton yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan corong *Buchner*, sehingga

filtrat dan residu dapat terpisah. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary vaccum evaporator* untuk menghasilkan ekstrak aseton kental.

### 3.4.3 Identifikasi Senyawa Flavonoid Secara Kualitatif

Ekstrak kental aseton yang diperoleh dari hasil maserasi dilarutkan dalam 1 mL aseton. Kemudian ditambahkan 1 gram Mg dan 10 mL HCl pekat secara perlahan – lahan melalui dinding tabung reaksi. Jika terjadi perubahan warna larutan menjadi warna kuning maka menandakan adanya flavonoid.

### 3.4.4 Pemisahan Senyawa

Setelah diperoleh ekstrak kental aseton, dilakukan KLT untuk mencari eluen yang cocok untuk proses pemisahan dengan menggunakan metode kromatografi vakum cair. Eluen yang digunakan yakni, heksan 100%, heksan : etil asetat = 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, dan etil asetat 100%. Berdasarkan hasil KLT, maka dapat ditentukan eluen yang cocok digunakan dalam proses kromatografi vakum cair yakni, heksan : etil asetat = 8:2 dilakukan sebanyak empat kali, 7:3 dilakukan sebanyak empat kali, 4:6 dilakukan sebanyak dua kali, 2:8 dilakukan sebanyak dua kali, dan etil asetat 100% dilakukan sebanyak dua kali. Setiap fraksi ditampung sebanyak 100 mL.

Fraksi – fraksi yang diperoleh dari hasil kromatografi vakum cair, kemudian dianalisa menggunakan KLT kembali untuk mendapatkan pola penggabungan fraksi sehingga diperoleh 9 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian

dianalisa menggunakan KLT dengan eluen heksan : etil asetat 7:3 dan diklorometan : metanol 9:1. Hasilnya, diperoleh 5 fraksi ( $A_1$ ,  $B_1$ ,  $C_1$ ,  $D_1$ , dan  $E_1$ ), dan untuk memperoleh fraksi terbaik dilakukan pemisahan senyawa kembali menggunakan metode kromatografi vakum cair. Kromatografi vakum cair yang dilakukan menggunakan sampel sebanyak 1,451 gram dengan eluen heksan : etil asetat = 9:1 dilakukan sebanyak 2 kali, 8:2 dilakukan sebanyak 4 kali, 7:3 dilakukan sebanyak 3 kali, 1:1 dilakukan sebanyak 1 kali, dan etil asetat 100% dilakukan sebanyak 1 kali. Fraksi yang dihasilkan sebanyak 11 fraksi. Fraksi – fraksi tersebut selanjutnya dianalisa menggunakan KLT, dengan melihat kemiripan pola KLT yang sama maka fraksi tersebut dapat digabungkan menjadi 6 fraksi ( $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$ ,  $D_2$ ,  $E_2$ , dan  $F_2$ ). Fraksi yang mempunyai % inhibisi terbesar diperoleh dari hasil uji aktivitas inhibisi keenam fraksi tersebut. Fraksi  $B_2$  merupakan fraksi yang memiliki % inhibisi terbesar dengan % inhibisi sebesar 72,93%.

#### **3.4.5 Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase**

Tahap pengujian aktivitas inhibisi dilakukan dengan metode Miyazawa dan Tamura, 2007, yang telah dimodifikasi.

- a). Blanko: 760  $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 6,5, 40  $\mu$ L DMSO, dan 200  $\mu$ L akuades.
- b). Kontrol : 560  $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 6,5, 40  $\mu$ L DMSO, 200  $\mu$ L L-tirosin, dan 200  $\mu$ L larutan tirosinase.

c). Sampel : 560  $\mu$ L larutan buffer fosfat pH 6,5, 40  $\mu$ L larutan sampel, 200  $\mu$ L L-tirosin, dan 200  $\mu$ L larutan tirosinase

Masing – masing blanko, kontrol, dan sampel dimasukkan ke dalam *ependorf microcentrifuge tube* dengan komposisi seperti di atas, kemudian secara bersama – sama diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Aktivitas inhibisi dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer Visible pada panjang gelombang 475 nm. Dari data absorbansi ini dapat diketahui persen inhibisi menurut Chang *et al*, 2005 dengan rumus sebagai berikut:

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

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