

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI yang dimulai pada bulan Maret tahun 2011 sampai dengan bulan Desember tahun 2011.

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

##### **3.1.1 Alat**

Alat yang dibutuhkan untuk penelitian ini yaitu set alat destilasi, neraca analitik 3 digit (HF 300 AND) dan 4 digit (*Advebturer Ohaus*), tabung maserasi, *rotary vaccum evaporator*, termometer, corong *Buchner*, kolom kromatografi berdiameter 7 cm, *chamber*, blender, dan alat-alat gelas dasar. Sedangkan untuk keperluan analisis digunakan spektrofotometer UV/Vis Shimadzu 1240 dan kromameter.

##### **3.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* Lamk, serbuk Mg (p.a), HCl pekat, aseton (p.a), etil asetat (p.a), n-heksan (p.a), dimetilsulfoksida (DMSO), kromatografi lempeng tipis (KLT), silika gel Merck Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (sebagai adsorben pada kromatografi vakum cair), silika gel Merck 60 (37-70 mesh, sebagai silika impreg pada kromatografi vakum cair), larutan buffer fosfat pH 6,5, L-tirosin, larutan tirosinase, kentang dieng, dan aquades.

#### **3.2 Metode Penelitian**

Karima Huril Aini, 2012  
Produksi Tepung Kentang ....

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu:

- Tahap pertama : determinasi tumbuhan *Artocarpus heterophyllus* yang dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB Bandung.
- Tahap kedua : pengeringan dan penggilingan kulit batang *Artocarpus heterophyllus* di Balai Besar Pulp dan Kertas.
- Tahap ketiga : ekstraksi serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut aseton.
- Tahap keempat : identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak aseton hasil maserasi serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* secara kualitatif.
- Tahap kelima : ekstrak aseton yang diperoleh dianalisis menggunakan KLT dengan variasi konsentrasi pelarut heksan : etil asetat (heksan 100%, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, dan etil asetat 100%) untuk mengetahui eluen yang tepat bagi KVC.
- Tahap keenam : ekstrak aseton yang diperoleh dimurnikan menggunakan KVC dengan variasi konsentrasi pelarut heksan : etil asetat (8:2 dilakukan empat kali; 7:3 dilakukan empat kali; 4:6 dilakukan tiga kali; 2:8 dilakukan dua kali dan etil asetat 100% dilakukan dua kali) untuk mendapatkan fraksi fraksi aktif inhibitor tirosinase.
- Tahap ketujuh : pengujian aktivitas inhiiksi fraksi hasil pemisahan terhadap reaksi enzimatik tirosin-tirosinase dengan cara mengukur absorbansi larutan sampel dengan menggunakan spektrofotometer Visible pada panjang

gelombang 475 nm. Dari data absorbansi yang terukur dapat diketahui persen inhibisi tirosinase menurut Chang *et al.* (2005) dengan rumus sebagai berikut :

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

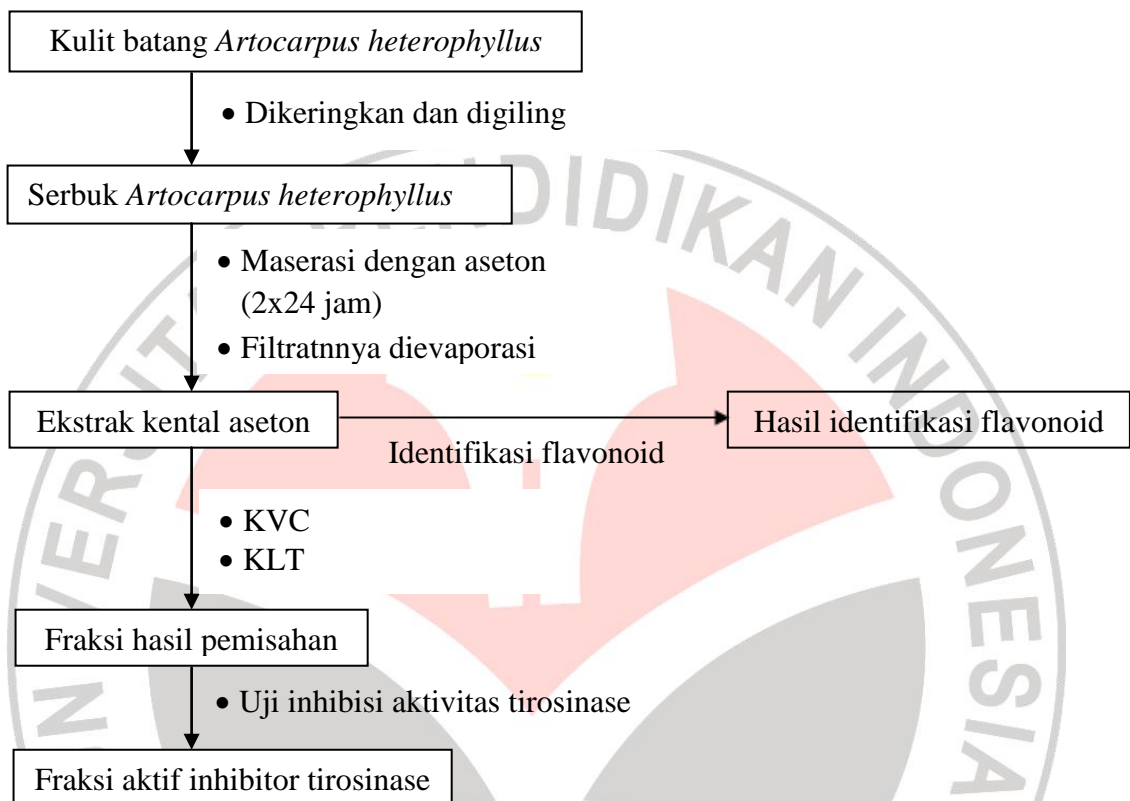
A adalah absorbansi larutan tanpa sampel (larutan buffer fosfat 0.1 M, larutan L-tirosin, DMSO dan larutan tirosinase) dan B adalah absorbansi dengan penambahan sampel (larutan sampel, larutan bufferfosfat 0.1 M, larutan L-tirosin, DMSO dan larutan tirosinase).

- Tahap ketujuh : aplikasi fraksi aktif inhibitor tirosinase untuk pembuatan tepung kentang dengan variasi konsentrasi fraksi aktif inhibitor tirosinase dan variasi massa kentang. Pengujian aktifitas inhibisi fraksi fraksi aktif inhibitor tirosinase terhadap reaksi enzimatis yang terjadi pada kentang dengan cara mengukur absorbansi sampel dengan menggunakan spektrofotometer Visible pada panjang gelombang 475 nm. Dari data absorbansi yang terukur dapat dihitung persen inhibisi polifenol oksidase menurut Chang *et al.* (2005) dengan rumus sebagai berikut :
 
$$\% \text{ inhibisi tirosinase} = [(A-B)/A] \times 100\%$$

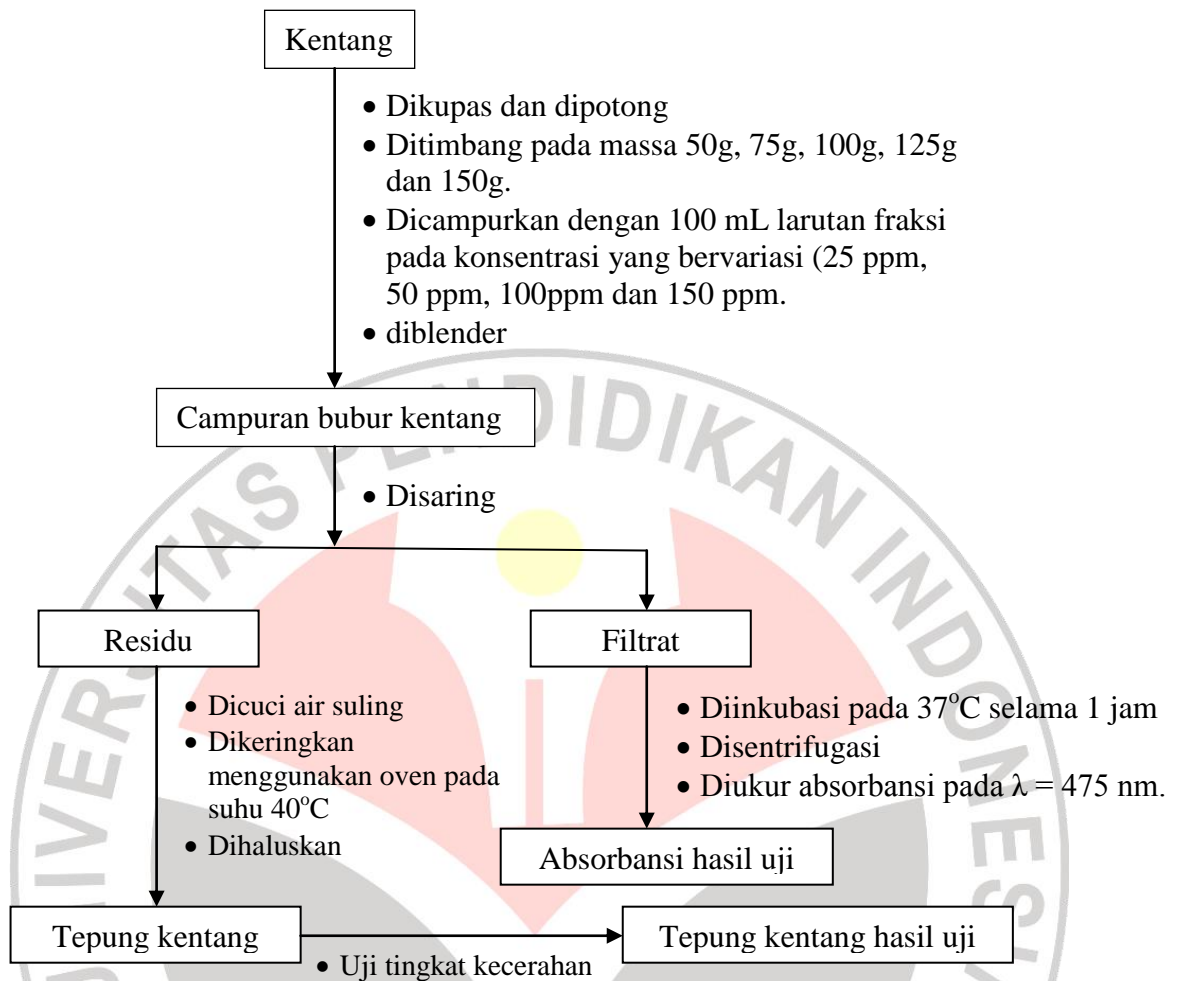
A adalah absorbansi larutan kentang tanpa fraksi aktif inhibitor tirosinase (kontrol) dan B adalah absorbansi larutan kentang dengan penambahan fraksi aktif inhibitor tirosinase.
- Tahap kedelapan : penentuan tingkat pencoklatan pada tepung kentang yang telah dibuat dengan menambahkan fraksi aktif inhibitor tirosinase dengan menggunakan kromameter.

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

Secara umum tahapan penelitian yang dilakukan tertera pada bagan dibawah ini:



**Gambar 3.1.** Bagan alir proses penentuan fraksi aktif inhibitor tirosinase



Gambar 3.2. Bagan alir proses pembuatan tepung kentang.

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Preparasi Sampel**

Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* yang digunakan dalam penelitian berasal dari Sumedang yang kemudian untuk mengetahui spesies tanaman dideterminasi di Sekolah Ilmu Tinggi Hayati (SITH) ITB Bandung.

Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* dibersihkan dan dikeringkan selama kurang lebih satu bulan. Setelah itu digiling sampai berbentuk serbuk dengan ukuran 60 mesh, di Balai Besar Pulp dan Kertas Bandung.

#### **3.4.2 Ekstraksi**

Serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* ditimbang sebanyak satu kilogram. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung maserasi, dan dimaserasi menggunakan pelarut aseton selama 2x24 jam. Hasil maserasi didapatkan ekstrak aseton kulit batang *Artocarpus heterophyllus*. Ekstrak aseton dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak kental aseton kulit batang *Artocarpus heterophyllus*.

#### **3.4.3 Analisis Kualitatif Senyawa Flavonoid**

Ekstrak kental ditambahkan pelarut aseton sebanyak satu mL kemudian ditambahkan serbuk Mg sebanyak satu gram dan HCl pekat sebanyak 10 mL. Warna kuning yang dihasilkan menandakan adanya senyawa flavon di dalam ekstrak tersebut.



#### 3.4.4 Pemisahan Fraksi Aktif Inhibitor Tirosinase

Pemisahan senyawa dilakukan dengan menggunakan kromatografi lempeng tipis (KLT) dan kromatografi vakum cair (KVC). KLT dilakukan untuk menentukan eluen yang cocok yang akan digunakan pada pemisahan menggunakan KVC. Eluen yang digunakan untuk KLT yaitu heksan : etil asetat (n-heksan 100%, 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 dengan menggunakan berbagai pelarut, maka eluen yang digunakan untuk KVC yaitu heksan : etil asetat (8:2 dilakukan empat kali, 7:3 dilakukan 4 kali, 4:6 dilakukan tiga kali, 2:8 dilakukan dua kali, dan etil asetat 100% dilakukan dua kali). Sebelum dilakukan KVC sampel terlebih dahulu diimpregnasi dengan sampel : silika impreg = 1:2.

Fraksi-fraksi yang dihasilkan pada KVC kemudian dilakukan KLT kembali. Fraksi-fraksi yang memiliki pola yang sama digabungkan dan dilakukan uji inhibisi.

#### 3.4.5 Uji Aktivitas inhibisi Tirosinase Larutan Fraksi Aktif Ekstrak Aseton

Tahap pengujian aktivitas inhibisi tirosinase dilakukan dengan metode Miyazawa dan Tamura, (2007), yang telah dimodifikasi. Pada pengujian ini dibuat larutan blanko, kontrol dan sampel dengan komposisi sebagai berikut:

1. Blanko : 760  $\mu$ L larutan buffer fosfat 0,1M (pH=6,5), 40  $\mu$ L DMSO, dan 200  $\mu$ L akuades.
2. Kontrol : 660  $\mu$ L larutan buffer fosfat 0,1M (pH=6,5), 40  $\mu$ L DMSO, 200  $\mu$ L L-Tirosin, dan 100  $\mu$ 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.

Masing-masing larutan blanko, kontrol dan sampel dimasukkan ke dalam *ependorf microcentrifuge tube*, untuk larutan tirosinase dimasukkan dalam *ependorf microcentrifuge tube* yang berbeda dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, larutan tirosinase dimasukkan ke dalam larutan kontrol dan sampel kemudian masing-masing larutan blanko, kontrol dan sampel diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi sisa reaksi menggunakan spektrofotometer Visible pada panjang gelombang 475 nm. Hasil data absorbansi yang diperoleh dapat diketahui persen inhibisi tirosinase menggunakan metode Chang *et al.* (2005).

#### **3.4.6 Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase pada Pembuatan Tepung Kentang**

Tahap pengujian aktivitas inhibisi tirosinase pada pembuatan tepung kentang menggunakan metode Lee *et al.* (2001), yang telah dimodifikasi. Sebanyak 100 g kentang dicampurkan dengan 100 mL larutan fraksi aktif inhibitor tirosinase dengan variasi konsentrasi (25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 150 ppm). Kemudian diblender sehingga diperoleh campuran bubur kentang dan larutan fraksi aktif inhibitor tirosinase. Campuran dipisahkan antara filtrat dan endapannya. Filtrat tersebut diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C lalu diuji aktivitas inhibisi polifenoloksidase dengan cara mengukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Visible pada panjang gelombang 475 nm.



### 3.4.7 Uji Tingkat Kecerahan Tepung Kentang

Kentang dengan variasi massa tertentu (50 g, 75 g, 100 g, 125 g dan 150 g) dicampurkan dengan 100 mL larutan fraksi aktif inhibitor tirosinase dengan konsentrasi yang paling besar. Kemudian diblender sehingga diperoleh campuran bubuk kentang dan larutan fraksi aktif inhibitor tirosinase. Campuran dipisahkan antara filtrat dan endapannya. Endapan dicuci dengan menggunakan aquades, dikeringkan dan dihaluskan sehingga diperoleh tepung kentang. Tepung kentang tersebut diuji tingkat pencoklatannya menggunakan kromameter.

