

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain neraca analitik, set alat maserasi, *rotary evaporator*, pHmeter, *freezer*, pipet mikro, *ependorf microcentrifuge tube*, *autoclave*, *waterbath*, termometer, *stopwatch*, spatula, botol semprot, penyangga dan berbagai peralatan gelas seperti gelas kimia, gelas ukur, kaca arloji, labu takar, batang pengaduk dan pipet tetes. Untuk keperluan analisis digunakan Spektrofotometer UV-VIS Mini Shimadzu 1240 yang terdapat di Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia, FPMIPA UPI.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan selama penelitian ini meliputi serbuk kulit batang *A. heterophyllus*; metanol; larutan buffer fosfat 0,1 M (pH 6,5); larutan L-tirosin 0,03%; larutan L-tirosin 0,06%; larutan tirosinase (524,4 U/mL); DMSO dan aquades.

Kulit batang *A. Heterophyllus* yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari perkebunan warga di daerah Indramayu (Jawa Barat). Tirosinase dan L-tirosin yang digunakan berasal dari Sigma-aldrich.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari beberapa tahap diantaranya adalah sebagai berikut:

- Tahap pertama: pengeringan dan penggilingan kulit batang *A. heterophyllus*.
- Tahap kedua: ekstraksi seluruh zat yang terdapat dalam serbuk kulit batang *A. heterophyllus* dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol.
- Tahap ketiga: evaporasi seluruh zat yang telah dimaserasi menggunakan pelarut metanol hingga didapatkan ekstrak kental metanol.
- Tahap keempat: uji inhibisi tirosinase dengan ekstrak kental metanol kulit batang *A. heterophyllus* dibandingkan dengan blanko dan kontrol positif.
- Tahap kelima: analisis kinerja inhibisi hasil ekstraksi terhadap reaksi enzimatis tirosin-tirosinase dibandingkan dengan blanko dan kontrol positif. Perubahan intensitas warna hasil reaksi diukur melalui spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 475 nm. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan produk (dopakrom). Dari pengukuran absorbansi ini maka dapat dihitung persentase aktivitas inhibisi tirosinase menurut metode Chang *et al* (2005) dengan rumus sebagai berikut:

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

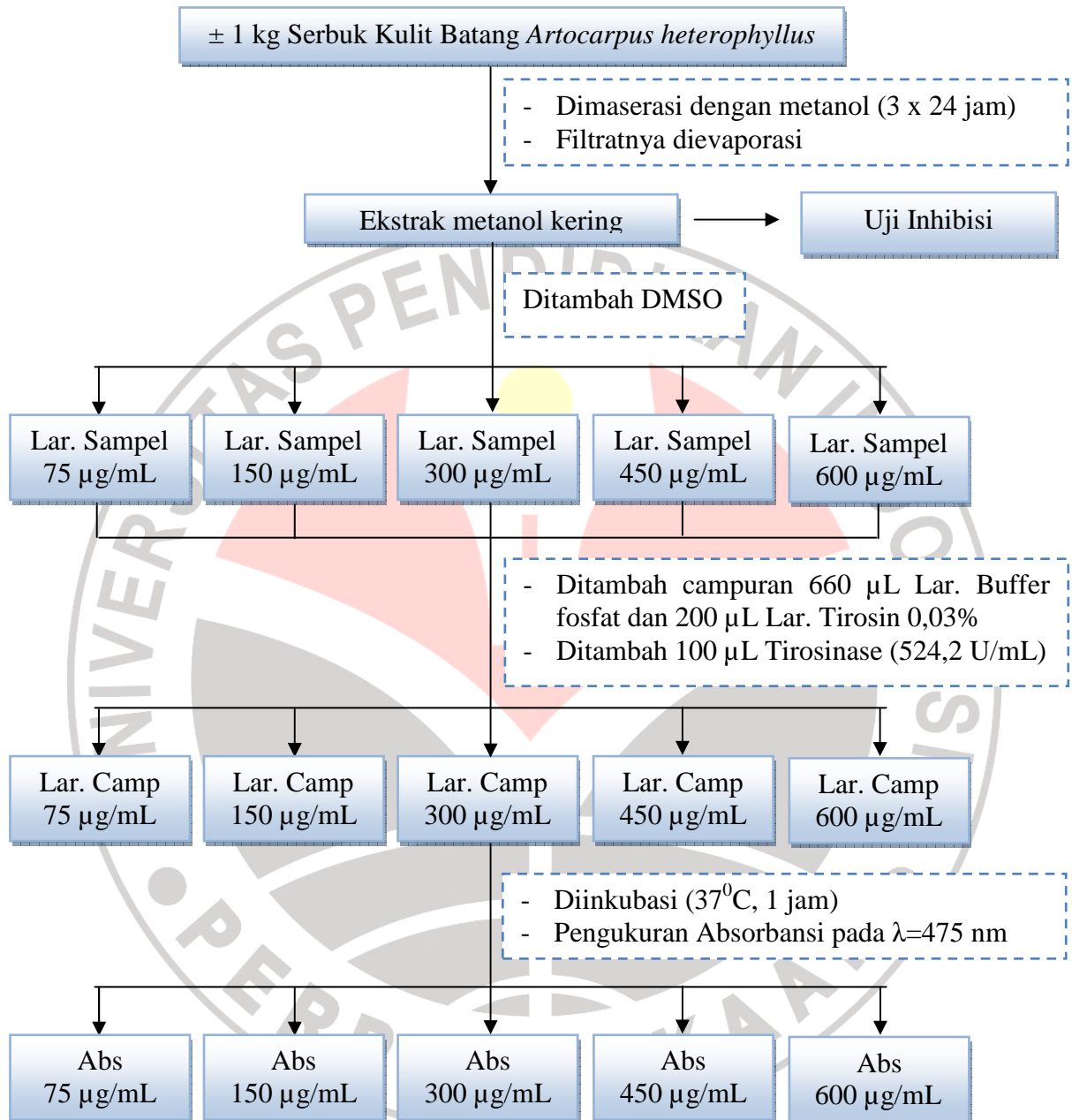
A adalah absorbansi larutan tanpa sampel atau kontrol positif (larutan buffer fosfat 0,1 M, Larutan L-tirosin, DMSO, larutan tirosinase) dan B adalah absorbansi dengan penambahan sampel (larutan buffer fosfat 0,1 M, larutan L-tirosin, larutan sampel, larutan tirosinase).

Persentase aktivitas inhibisi tirosinase yang diperoleh digunakan untuk penentuan IC_{50} .

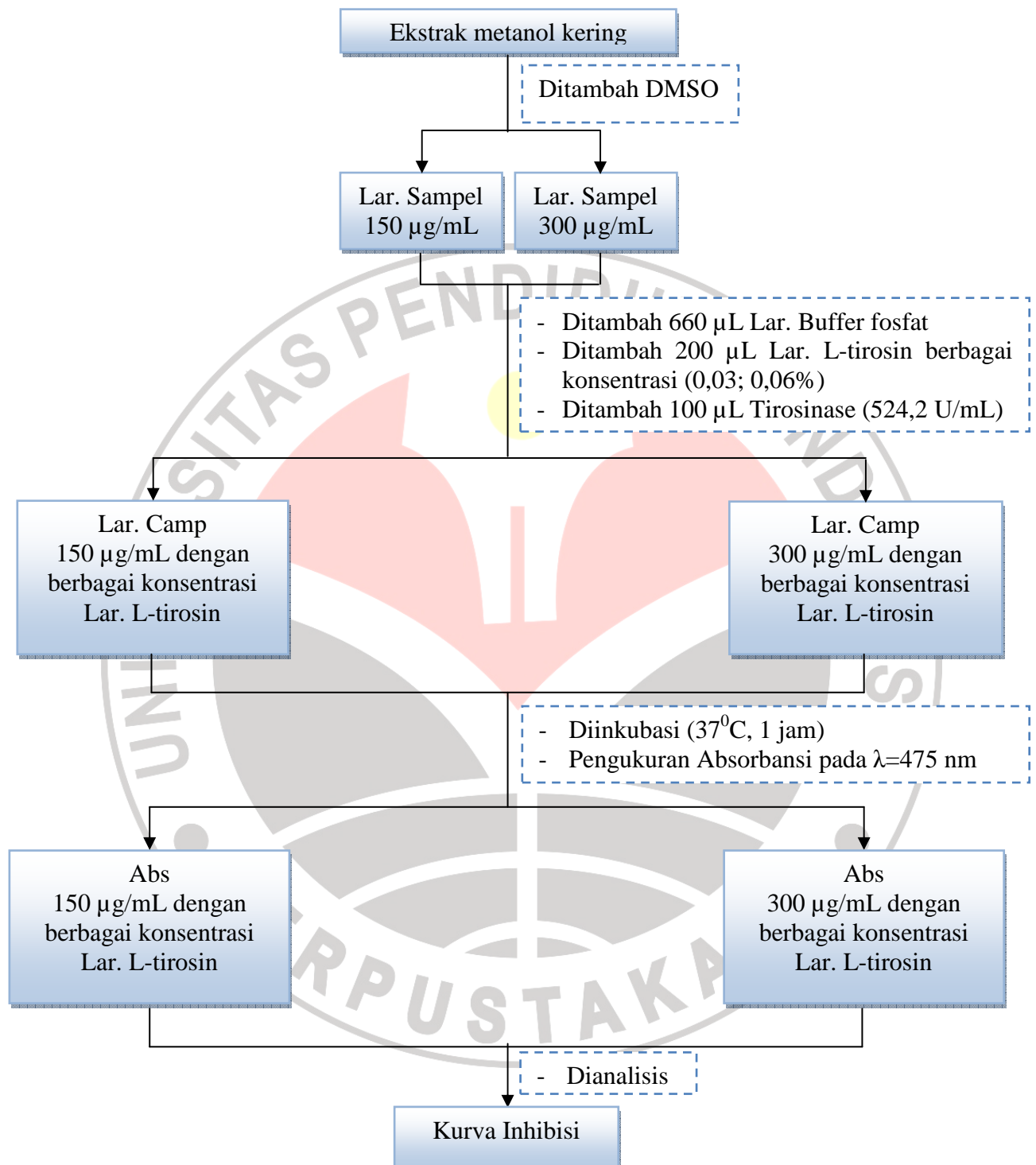
- Tahap keenam: penentuan mekanisme dan jenis inhibisi dari senyawa bioaktif ekstrak kulit batang *A. heterophyllus* dengan cara membuat kurva Lineweaver-Burk dari data inhibisi reaksi antara beragam konsentrasi L-tirosin dengan tirosinase yang diperoleh dan membandingkannya dengan kurva Lineweaver-Burk pada umumnya.



3.3 Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir Penentuan IC₅₀



Gambar 3.2 Bagan Alir Penentuan Jenis Inhibisi

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Penyiapan Sampel

Pada awal penelitian, dilakukan penentuan spesies tumbuhan atau determinasi tumbuhan di Herbarium Bandungense Program Studi Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) ITB. Selanjutnya, kulit batang *A. heterophyllus* dikeringkan pada suhu kamar selama 1 bulan dan digiling hingga menjadi serbuk kulit batang. Penggilingan kulit batang dilakukan di Balai Besar Pulp dan Kertas, Bandung.

3.4.2 Ekstraksi Serbuk Kulit Batang *A. heterophyllus*

Serbuk kulit batang *A. heterophyllus* ditimbang sebanyak ± 1 kg kemudian diekstraksi dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam dengan metanol. Setelah perendaman dilakukan, ekstrak cair hasil maserasi disaring menggunakan corong Buchner, kemudian hasil penyaringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vaccum*.

Ekstrak metanol yang diperoleh, dilarutkan dalam pelarut DMSO. Larutan yang dihasilkan (larutan sampel) dibuat dengan berbagai konsentrasi (75 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ dan 450 $\mu\text{g/mL}$).

3.4.3 Tahap Pengujian

Tahap pengujian dilakukan dengan metode Miyazawa & Tamura (2006), yang telah dimodifikasi. Sebanyak 660 μL larutan buffer fosfat (pH 6,5) 0,1 M, 40 μL larutan sampel (75; 150; 300 dan 450 $\mu\text{g/mL}$), 200 μL L-tirosin (0,03% dan

0,06%), dan 100 μL larutan tirosinase dimasukkan ke dalam *eppendorf microcentrifuge tube*, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

3.4.4 Tahap Analisis

Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer Visibel pada panjang gelombang 475 nm. Data absorbansi yang diperoleh, dianalisis untuk menentukan jenis dan mekanisme inhibisi yang terjadi. Hasil pengujian dibandingkan juga dengan reaksi positif. Langkah-langkah di atas dilakukan sebanyak dua kali.

