

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Untuk melakukan kegiatan penelitian diperlukan peralatan laboratorium, bahan, dan juga cara kerja penelitian. Berikut merupakan uraian mengenai tiga hal tersebut.

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini, antara lain labu maserasi, termometer, box stereofom, neraca analitik 4 digit, *grinder*, *rotary evaporator*, dan beberapa peralatan gelas, seperti: batang pengaduk, pipet mikro, corong *Buchner*, spatula, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, labu Erlenmeyer berpenghisap, seperangkat alat ekstraksi berupa dua buah corong pisah kecil, serta labu dasar bulat. Sementara alat yang digunakan untuk keperluan analisis adalah *eppendorf microcentrifuge tube*, *water bath*, serta spektrofotometer UV-Vis yang terdapat di Laboratorium instrumen jurusan pendidikan kimia, FPMIPA UPI.

3.1.2 Bahan

Bahan yang diperlukan untuk digunakan dalam penelitian, antara lain kulit batang *Artocarpus heterophyllus* (nangka), natriumdihidrogenfosfat dan dinatriumhidrogenfosfat untuk pembuatan larutan buffer fosfat pH 6,5, magnesium, asam klorida pekat, dimetilsulfoksida (DMSO), aquades, larutan L-tirosin 0,03%, dan larutan

tirosinase. Beberapa pelarut organik yang digunakan adalah aseton, metanol, dan n-butanol.

3.2 Metode Penelitian

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

- Tahap pertama: determinasi tanaman *Artocarpus heterophyllus* yang dilakukan di Sekolah Ilmu Tinggi Hayati (SITH) ITB Bandung.
- Tahap kedua: pengeringan dan penggilingan kulit batang *Artocarpus heterophyllus*.
- Tahap ketiga: ekstraksi seluruh zat yang terdapat dalam serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol.
- Tahap keempat: identifikasi flavonoid dari ekstrak metanol hasil maserasi kulit batang *Artocarpus heterophyllus* secara kualitatif.
- Tahap kelima: fraksinasi zat-zat atau campuran yang terdapat dalam ekstrak metanol hasil maserasi dengan menggunakan dua jenis pelarut, yaitu n-butanol dan aseton. Hal ini dimaksudkan untuk memisahkan senyawa bioaktif ke dalam fraksi-fraksi yang memiliki sifat yang sesuai dengan sifat fisik pengekstrak yang digunakan.
- Tahap keenam: penentuan fraksi terbanyak dalam mengekstraksi senyawa bioaktif.

- Tahap ketujuh: analisis aktivitas inhibisi dari ke tiga fraksi hasil ekstraksi terhadap reaksi enzimatik tirosin-tirosinase dengan cara mengukur absorbansi larutan sampel dengan menggunakan spektrofotometer Visible pada panjang gelombang 475 nm. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan produk (dopakrom). Dari pengukuran absorbansi ini dapat dihitung persen aktivitas inhibisi tirosinase menurut Chang *et al.*, 2005 dengan rumus sebagai berikut:

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

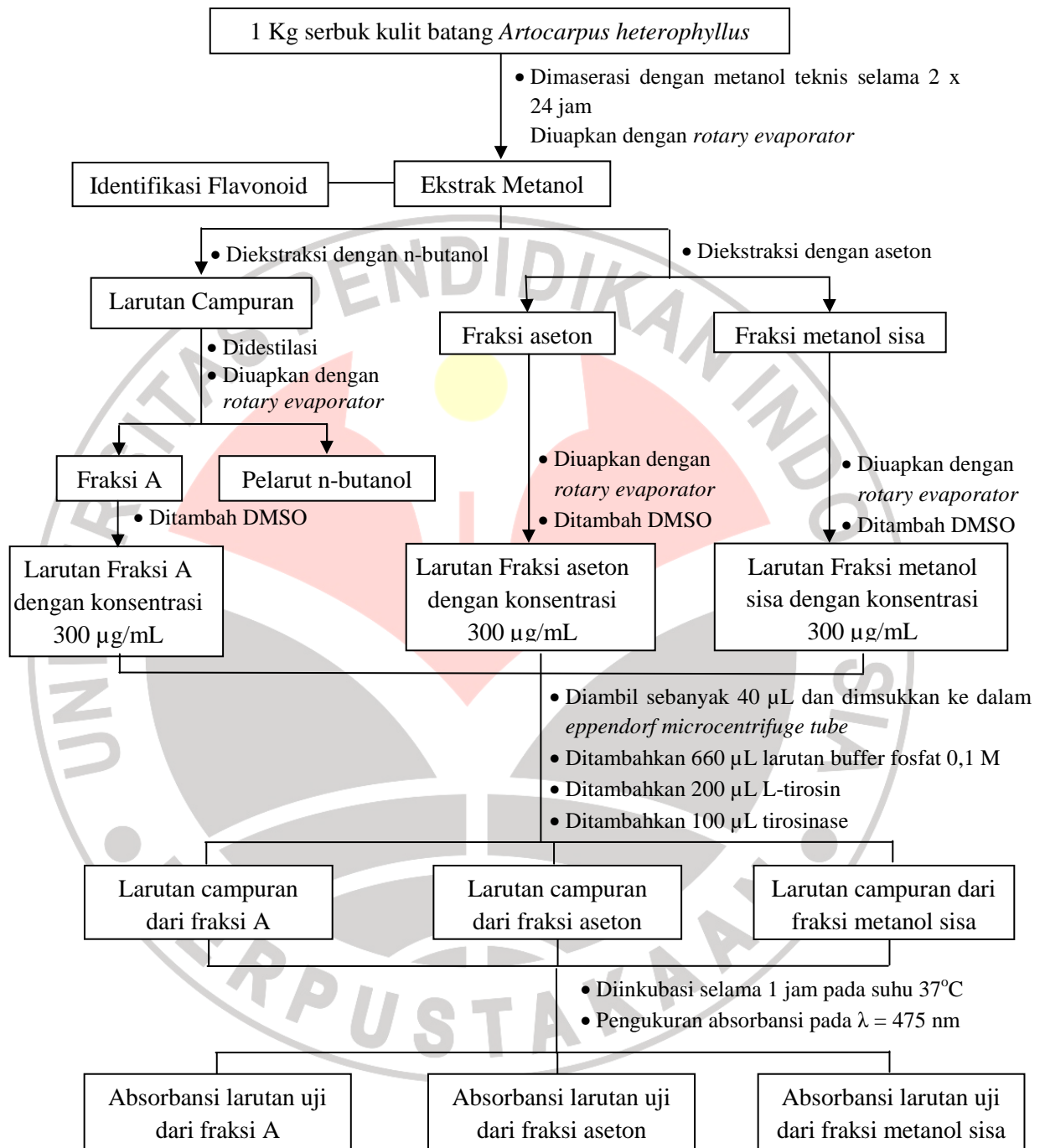
A adalah absorbansi larutan tanpa sampel (larutan buffer fosfat 0,1 M. Larutan L-tirosin, DMSO, larutan tirosinase) dan B adalah absorbansi dengan penambahan sampel (larutan buffer fosfat, larutan L-tirosin, larutan sampel, larutan tirosinase).

- Tahap kedelapan: penentuan IC_{50} dari fraksi yang memiliki kemampuan menginhibisi tirosinase paling optimal.

3.3 Bagan Alir Penelitian

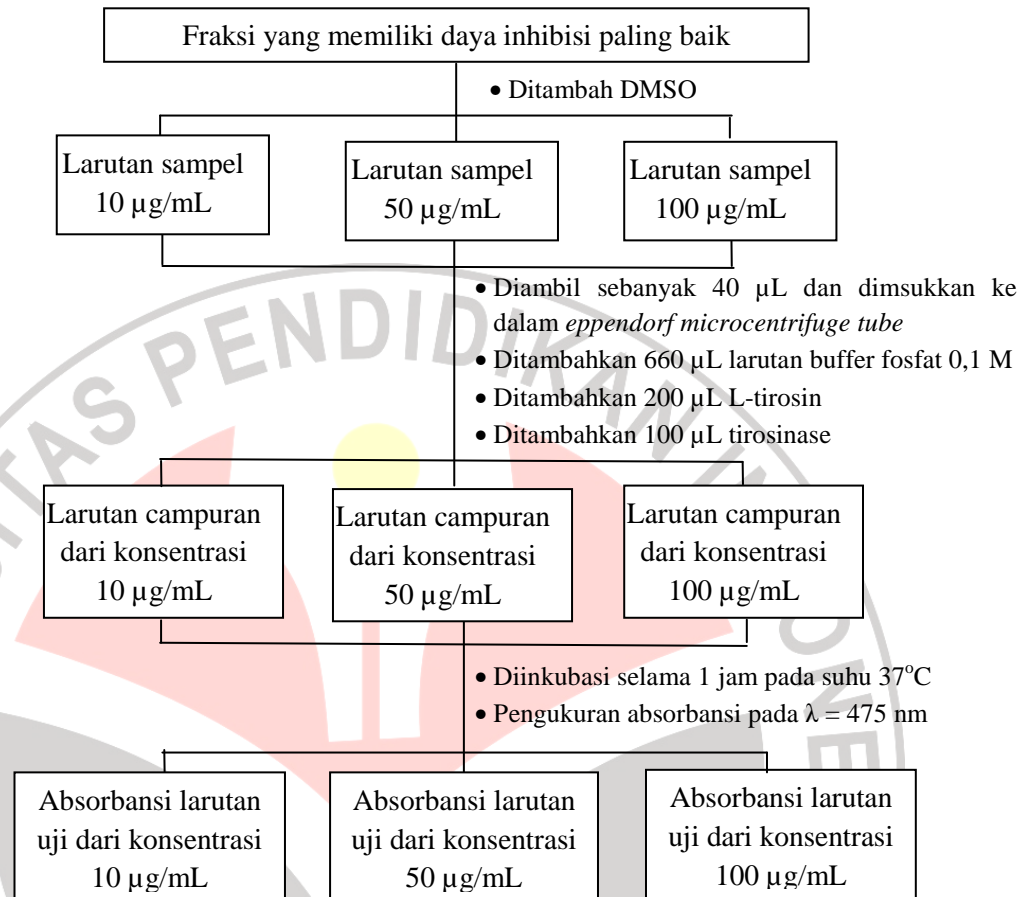
Untuk memudahkan dalam melakukan kegiatan penelitian, dibuatlah bagan alir penelitian seperti di bawah ini:

a. **Diagram Alir Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase**



Gambar 3.1. Bagan Alir Tahap Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase

b. Diagram Alir Penentuan IC₅₀



Gambar 3.2. Bagan Alir Tahap Penentuan IC₅₀

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Penyiapan Sampel

Sampel kulit batang *Artocarpus heterophyllus* diambil dari daerah Indramayu Kab. Indramayu yang kemudian dideterminasi di Sekolah Ilmu Tinggi Hayati (SITH) ITB Bandung untuk penentuan spesies tanaman.

Kulit batang *Artocarpus heterophyllus* yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari tanah dan lumut. Kemudian dikeringkan dan dihaluskan atau digiling sampai berbentuk serbuk. Proses penggilingan dilakukan di Balai Selulosa, Bandung.

3.4.2 Proses Ekstraksi

Serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* ditimbang sebanyak 1 kg kemudian diekstraksi dengan metode maserasi yang dilakukan selama 2 x 24 jam dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak cair dari hasil maserasi disaring dengan menggunakan corong *Buchner* kemudian filtratnya diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak kental metanol.

3.4.3 Identifikasi Senyawa Flavonoid Secara Kualitatif

Ekstrak kental dari hasil maserasi dilarutkan dengan menggunakan metanol sebanyak 1 mL. Kemudian ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat. Jika larutan menimbulkan warna kuning menunjukkan adanya flavonoid (Elsa Natalia, 2008).

3.4.4 Proses Fraksinasi

Ekstrak kental metanol dari hasil maserasi ditimbang kemudian dilarutkan dalam metanol kemudian ditambahkan dengan n-butanol. larutan campuran yang diperoleh didestilasi dengan menggunakan destilasi

sederhana hingga diperoleh destilat dan residu. Residu yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kentalnya yang merupakan fraksi A.

Untuk memperoleh fraksi aseton, ekstrak kental metanol dari hasil maserasi ditimbang kemudian diekstraksi dengan menggunakan aseton sebanyak dua kali. Larutan aseton yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil akhir dari proses ini adalah fraksi aseton dan fraksi metanol sisa (sisa dari hasil ekstraksi dengan pelarut aseton). Ekstrak kental dari masing-masing fraksi ditimbang hingga diperoleh massanya.

3.4.5 Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase dan Penentuan IC₅₀

Pada tahap pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode menurut Mitsuo Miyazawa dan Naotaka Tamura, 2007, dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 660 μL larutan buffer fosfat pH 6,5, 40 μL larutan sampel, 200 μL L-tirosin, dan 100 μL larutan tirosinase dimasukkan ke dalam *ependorf microcentrifuge tube*, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Aktifitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel menggunakan spektrofotometer visible dengan panjang gelombang 475 nm. Absorbansi yang diperoleh diubah dalam bentuk persen inhibisi dengan menggunakan rumus $[(A-B) / A] \times 100\%$.

Untuk menentukan IC_{50} dibuat grafik hubungan antara konsentrasi inhibitor terhadap persen inhibisi, kemudian dibuat persamaan regresi dari grafik tersebut dan dihitung IC_{50} -nya.

