

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah set alat destilasi sederhana, neraca analitik, labu maserasi, *rotary evaporator vacuum* Sibata B485, pHmeter Uchida, *freezer*, pipet mikro Sibata, *epENDORF microcentrifuge tube*, *autoclave*, *waterbath*, termometer, *stopwatch*, spatula, botol semprot, dan berbagai peralatan gelas seperti gelas kimia, gelas ukur, labu takar, pipet seukuran, pipet volum, pipet tetes, batang pengaduk, dan kaca arloji. Untuk keperluan analisis digunakan spektrofotometer UV-Vis Mini Shimadzu 1240 yang terdapat di Laboratorium Instrument Jurusan Pendidikan Kimia, FPMIPA UPI Bandung.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan selama penelitian ini meliputi serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* (nangka), aseton, larutan buffer fosfat 0,1 M (pH 6,5), larutan L-tirosin (0,03%), larutan tirosinase (309,68 U/mL), dimetil sulfoksida (DMSO), dan aquades.

3.2 Metode Penelitian

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

- Tahap pertama: ekstraksi seluruh zat yang terdapat dalam serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* dengan cara maserasi menggunakan pelarut aseton.
- Tahap kedua: evaporasi seluruh zat yang telah dimaserasi menggunakan *rotary evaporator vacuum* hingga didapat ekstrak pekat aseton.
- Tahap ketiga: uji inhibisi ekstrak pekat aseton kulit batang *Artocarpus heterophyllus* terhadap reaksi tirosin-tirosinase dibandingkan dengan kontrol. Perubahan intensitas warna hasil reaksi diukur menggunakan spektrofotometer Visibel pada panjang gelombang 475 nm. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan produk (dopakrom). Dari absorbansi pengukuran ini maka dapat dihitung persentase inhibisi tirosinase menurut metode Chang, dkk, (2005) dengan rumus sebagai berikut:

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

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

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

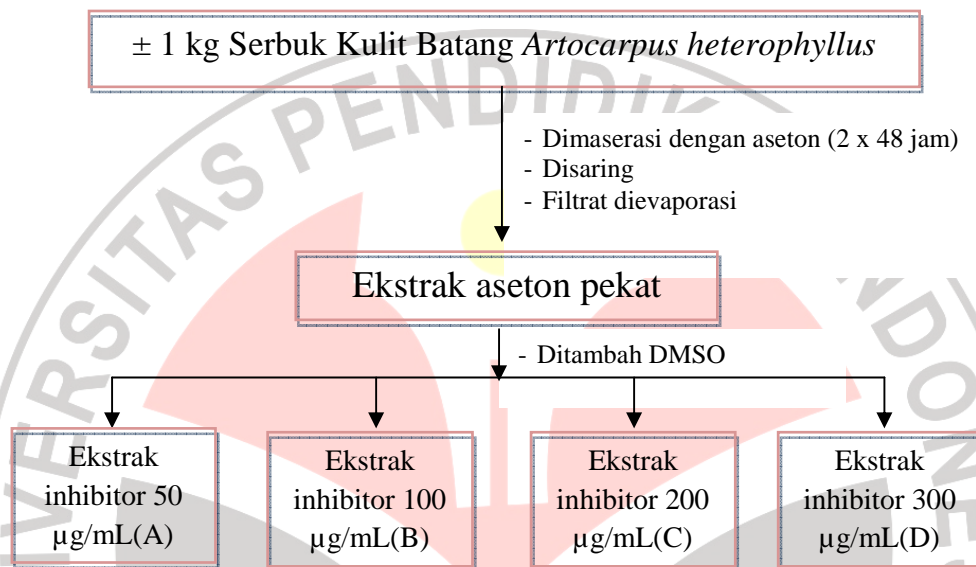
- Tahap keempat: penentuan jenis inhibisi dari senyawa bioaktif ekstrak kulit batang *Artocarpus heterophyllus* dengan cara membuat kurva Lineweaver-Burk dari data inhibisi reaksi antara beragam konsentrasi L-tirosin dengan tirosinase yang diperoleh dan membandingkannya dengan kurva Lineweaver-Burk tentang pengaruh inhibitor terhadap laju reaksi.



3.3 Bagan Alir Penelitian

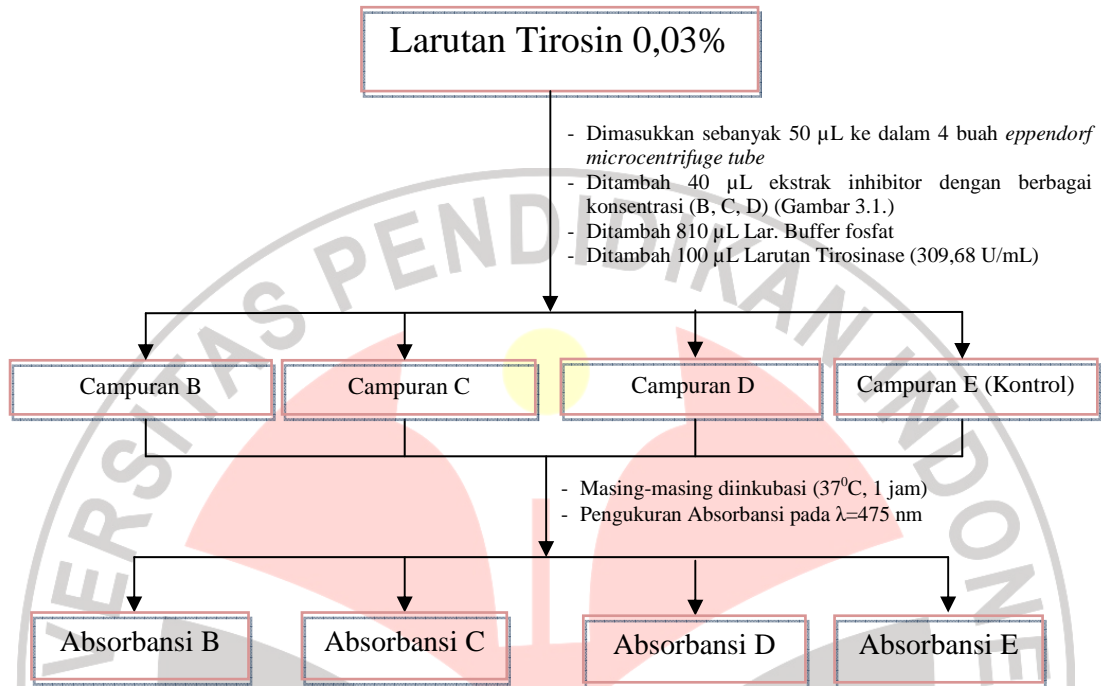
Penelitian yang dilakukan terdiri dari tiga tahap, yaitu:

1. Tahap Preparasi Ekstrak Inhibitor



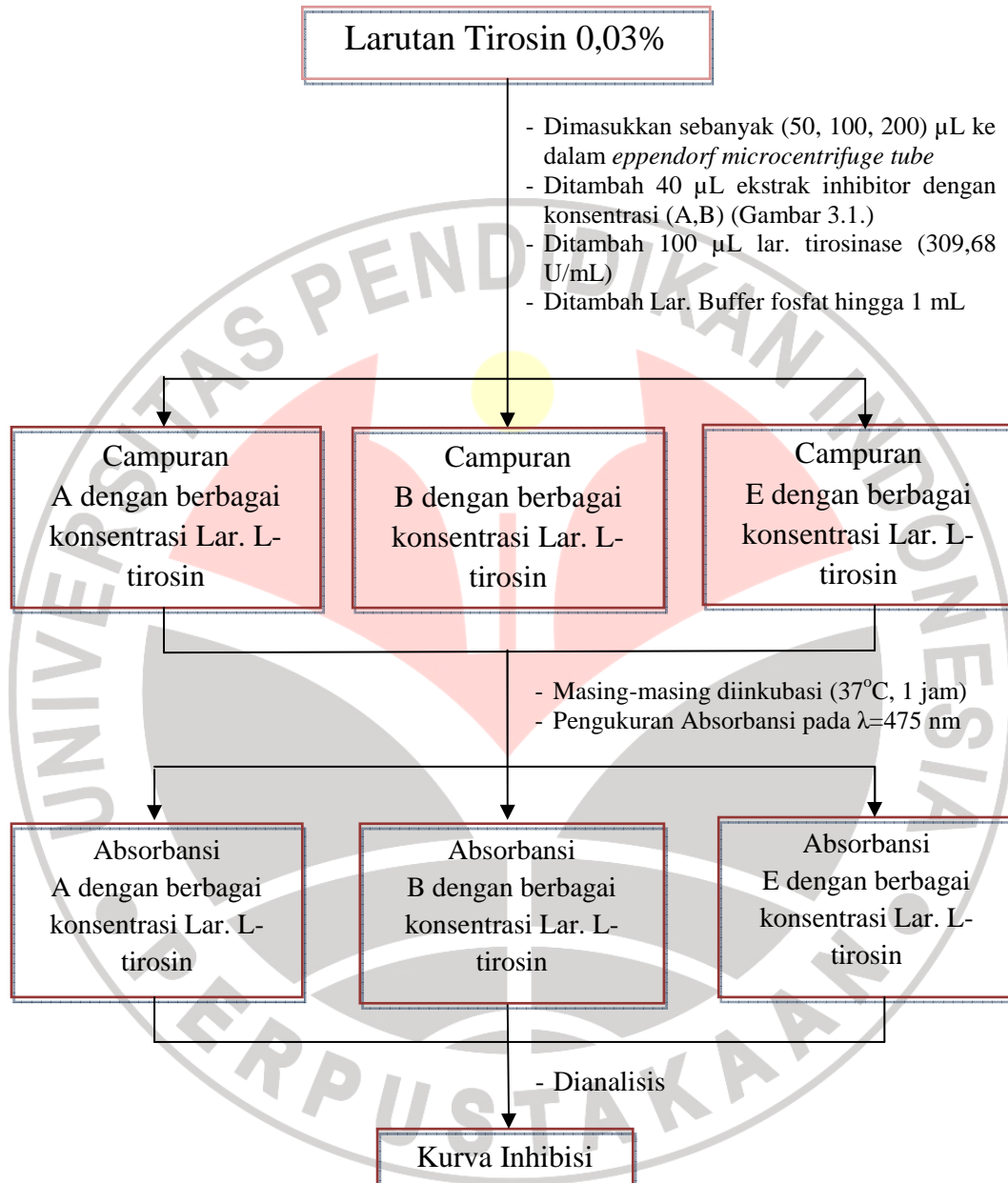
Gambar 3.1. Bagan Alir Preparasi Ekstrak Inhibitor Pada Berbagai Konsentrasi

2. Tahap Penentuan IC₅₀



Gambar 3.2. Bagan Alir Penentuan IC₅₀

3. Tahap Penentuan Jenis Inhibisi



Gambar 3.3. Bagan Alir Penentuan Jenis Inhibisi

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Ekstraksi Serbuk Kulit Batang *Artocarpus heterophyllus*

Serbuk kulit batang *Artocarpus heterophyllus* ditimbang sebanyak ± 1 kg kemudian diekstraksi dengan metode maserasi yang dilakukan selama 2 x 48 jam menggunakan aseton. Ekstrak aseton yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat aseton ditimbang hingga diperoleh massanya.

Larutan ekstrak aseton (larutan inhibitor) yang digunakan untuk uji aktivitas inhibisi tirosinase dibuat dengan berbagai konsentrasi (0 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, dan 300 $\mu\text{g/mL}$) yang terlarut dalam DMSO.

3.4.2 Tahap Pengujian

Pada tahap pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode menurut Mitsuo Miyazawa dan Naotaka Tamura (2006) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 50 μL L-tirosin, 40 μL larutan ekstrak aseton (konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, dan 300 $\mu\text{g/mL}$), 810 μL larutan buffer fosfat 0,1 M (pH 6,5), dan 100 μL larutan tirosinase (309,68 U/mL) dimasukkan ke dalam *ependorf microcentrifuge tube*, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.

3.4.3 Tahap Analisis

Uji inhibisi tirosinase dan jenis inhibisi ditentukan dengan mengukur absorbansi berbagai konsentrasi larutan inhibitor (ekstrak aseton kulit batang *Artocarpus heterophyllus*) menggunakan spektrofotometer Visibel pada panjang gelombang 475 nm. Data absorbansi yang diperoleh dianalisis untuk menentukan aktivitas dan jenis inhibisi yang terjadi.

