

## BAB III

### METODELOGI PENELITIAN

Dalam kegiatan penelitian ini yang diperlukan adalah peralatan laboratorium, bahan, dan cara kerja penelitian. Dibawah ini adalah uraian mengenai tiga hal tersebut.

#### 3.1 Alat dan Bahan

##### 3.1.1 Alat

Pada penelitian ini peralatan yang dibutuhkan adalah batang pengaduk, gelas kimia, gelas ukur, labu erlenmeyer berpenghisap, seperangkat alat ekstraksi yaitu dua buah corong pisah yang kecil dan labu dasar bulat, serta beberapa alat berupa termometer, box streofoam, neraca analitik 4 digit, grinder, *rotary evaporator*. Sementara alat yang diperlukan untuk analisis adalah *water baht*, *ependorf microcentrifuge tube*, serta spektrometer UV-Vis yang berada dilaboratorium instrumen jurusan pendidikan kimia.

##### 3.1.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian, antara lain batang *Artocarpus heterophyllus*,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (natriumdihidrogenfosfat) dan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (dinatriumhidrogenfosfat ) untuk pembuatan larutan buffer fosfat pH 6,5, asam klorida pekat, dimetilsulfoksida (DMSO), aquades, larutan enzim tirosinase, larutan L-tirosin 0,03 %, dan beberapa pelarut organik yang diperlukan adalah aseton, etanol, dan metanol.

### 3.2 Metode penelitian

1. Pengambilan sampel *Artocarpus heteropyllus* di Desa Wanamekar Kecamatan Wanaraja Kabupaten Garut.
2. Sampel *Artocarpus heteropyllus* dideterminasi, yang dilakukan di Sekolah Tinggi Ilmu Hayati (STIH) ITB.
3. Kulit batang *Artocarpus heteropyllus* dikeringkan pada suhu kamar.
4. Kulit batang *Artocarpus heteropyllus* digiling hingga menjadi serbuk, yang dilakukan di Balai Selulosa dan Kertas.
5. Ekstraksi terhadap semua zat yang terdapat di dalam serbuk kulit batang tumbuhan dengan cara maserasi dengan pelarut metanol, etanol, dan aseton.
6. Penentuan Daya inhibisi yang paling optimal di antara pelarut ekstraksi terhadap kinerja reaksi enzimatik tirosin-tirosinase.
7. Analisis kinerja inhibisi setiap ekstrak. Kinerja inhibisi diukur melalui absorbansi larutan sampel menggunakan alat Spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang sinar tampak (475 nm). Absorbansi yang terukur diubah menjadi persentase aktivitas inhibisi tirosinase berdasarkan Chang *et al* (2005) dengan rumus sebagai berikut :

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

A adalah Absorbansi larutan kontrol positif ( larutan PBS, larutan L-tirosin, dan larutan tirosinase 3393 U/12,7 mg), dan B adalah absorbansi larutan uji (larutan PBS, larutan L-tirosin, larutan tirosinase 3393 U/12,7 mg dan larutan sampel).

#### Tahap Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase

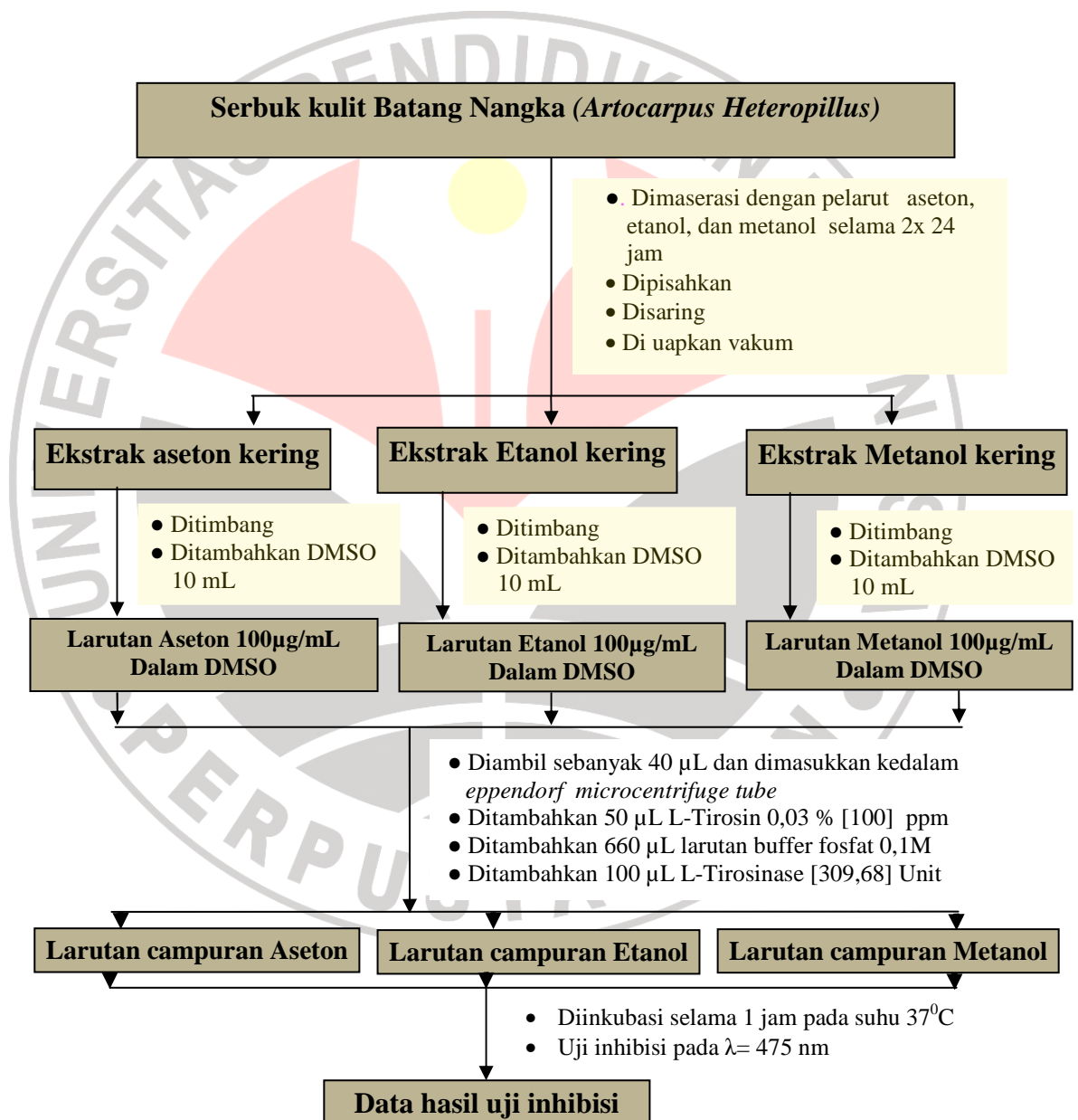
Uji inhibisi tirosinase dilakukan dengan modifikasi tertentu. Sebanyak 660  $\mu\text{L}$  buffer fosfat 0,1 M (pH 6,5), 200  $\mu\text{L}$  larutan L-tirosin 0,03 %, 40  $\mu\text{L}$  larutan sampel (konsentrasi masing-masing konsentrasi sampel adalah sama yaitu 100 ppm) dan 100  $\mu\text{L}$  larutan tirosinase (309,68 U/mL) dimasukkan dalam tabung tes (*ependorf microcentrifuge tube*), kemudian diinkubasi pada 37°C selama 1 jam.

Aktivitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan uji dengan Spektrofotometer VIS pada 475 nm.

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

Dibawah ini bagan alir penelitian dimana untuk mempermudah dalam melakukan kegiatan penelitian.

#### Diagram alir penelitian pengujian aktivitas inhibisi Tirosinase



Bagan Alir tahap Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase

### **3.4 Prosedur Kerja**

#### **3.4.1 Penyiapan sampel**

Kulit batang nangka diambil dari daerah garut dan setelah itu dideterminasi di Sekolah Tinggi Hayati (SITH) ITB Bandung untuk menentukan species tanaman tersebut. Kulit batang nangka yang akan digunakan sebagai sampel yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran tanah dan lumut. Kemudian dipotong hingga berukuran kecil, setelah itu dikeringkan sampai renyah dan dihalushan atau digiling hingga berbentuk serbuk halus. Proses penggilingan dilakukan dibalai Selulosa, Bandung.

#### **3.4.2 Proses Ekstrasi**

Kulit batang nangka yang sudah menjadi serbuk halus ditimbang sebanyak 1,5 kg kemudian diekstrasi dengan metode maserasi yang dilakukan selama 2 x 24 jam dengan menggunakan pelarut aseton, etanol, dan pelarut metanol. Setelah itu ekstrak cair dari hasil maserasi kemudian disaring dengan menggunakan corong *buchner* . filtrat yang didapat kemudian diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan tujuan untuk menghasilkan ekstrak kental dari ketiga pelarut yaitu aseton, etanol, dan metanol atau untuk memisahkan pelarut dari ekstrak kentalnya.

### 3.4.3 Proses penimbangan

Ekstrak kental yang sudah dipisahkan dari pelarut aseton, etanol, dan metanol kemudian ditimbang dengan menggunakan neraca analitik yang 4 digit.

### 3.4.4 Pengujian Aktivitas Inhibisi Tirosinase

Pada pengujian ini dilakukan penimbangan pada setiap sampel yaitu ekstrak aseton, ekstrak metanol, dan ekstrak etanol masing-masing 0,0010 gram, setelah itu dilarutkan dalam 10 mL larutan DMSO. Metode menurut Miyazawa dan Naotaka Tamura, (2007), dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 560  $\mu$ L Larutan PBS (buffer fosfat) pH 6,5, 40  $\mu$ L Larutan sampel, 200  $\mu$ L L-Tirosin, dimasukkan kedalam *epENDORF microcentrifuge tube*, begitupun dengan 200  $\mu$ L larutan tirosinase dalam ke adaan terpisah, kemudian di inkubasi awal dilakukan selama 15 menit setelah itu dihomogenkan kedalam larutan tirosinase dan dilakukan kembali inkubasi selama 1 jam pada suhu yang sama yaitu 37<sup>0</sup> C. Aktifitas inhibisi tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel menggunakan spektrofotometer visible dengan panjang gelombang 475 nm. Kemudian absorbansi yang di dapat di ubah dalam bentuk persen inhibisi dengan menggunakan rumus  $[(A-B) / A] \times 100 \%$