

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

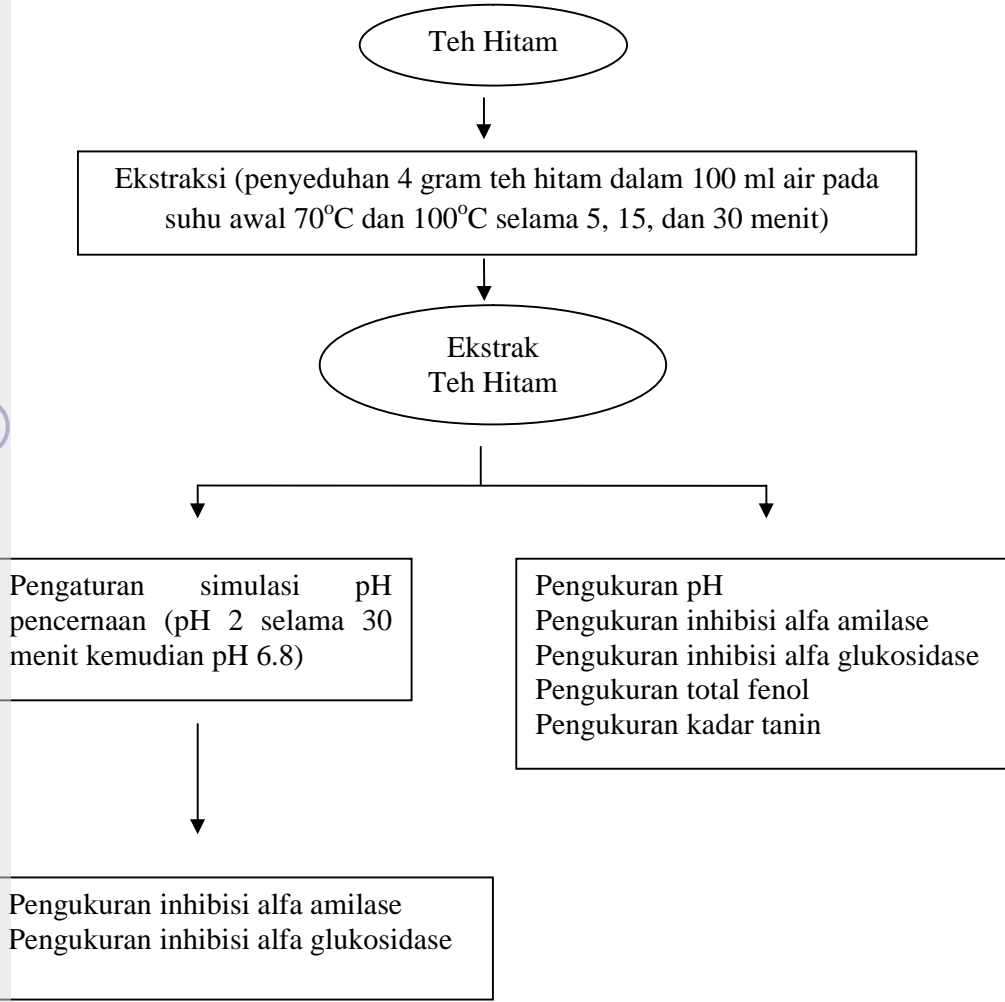
Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah teh hitam yang diperoleh dari PT Perkebunan Nusantara VIII Gunung Mas Bogor grade BP1 (*Broken Pekoe 1*). Bahan-bahan yang digunakan untuk menganalisis daya inhibisi enzim alfa amilase antara lain: enzim alfa amilase *porcine pancreas* (Sigma A3176), pati murni (Merck), pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), buffer natrium fosfat pH 6.9. Bahan-bahan yang digunakan untuk menganalisis daya inhibisi enzim alfa glukosidase antara lain: enzim alfa glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* tipe I (Sigma G5003), buffer kalium fosfat pH 6.8, larutan p-nitrofenil- -D-glukofiranosida (Sigma N1377), dan Na_2CO_3 . Bahan-bahan yang digunakan untuk mengukur total fenol antara lain: etanol 95%, *folin ciocalteau* 50%, Na_2CO_3 5%, asam galat 250 mg/L, dan akuades. Kadar tanin diuji dengan menggunakan bahan-bahan seperti HCl 32%, formalin (HCHO 37%), dan akuades. HCl 11.96 N dan NaOH 10 N digunakan untuk menetapkan pH proses pencernaan *in vitro*.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: spektrofotometer, pH meter, sentrifugasi, gelas piala, tabung reaksi, tabung sentrifugasi, kuvet, alat vortex, pipet dan mikropipet, penangas air, gelas ukur, neraca analitik, aluminium foil, penyaring vakum, termometer, waterbath, sudip, gelas pengaduk, gelas arloji, corong dan saringan.

B. Metode Penelitian

Penelitian pertama-tama dilakukan dengan menyeduh bubuk teh hitam dengan menggunakan suhu air dan lama penyeduhan yang berbeda. Ekstrak teh hitam yang didapat dari penyeduhan kemudian diberi dua perlakuan yang berbeda, yaitu ada yang diberi perlakuan pengaturan simulasi pH pencernaan dan ada yang tanpa diberi perlakuan (disebut ekstrak awal). Ekstrak yang dibiarkan seperti ekstrak awal langsung dilakukan beberapa uji, yaitu pengukuran pH, inhibisi enzim alfa amilase, inhibisi enzim alfa glukosidase, total fenol, dan kadar tanin. Ekstrak awal yang diberi pengaturan simulasi pH pencernaan pertama-tama diubah pH nya seperti pH lambung (pH 2) dan didiamkan selama 30 menit kemudian dinaikkan menjadi pH 6.8 seperti pH pada usus halus. Ekstrak tersebut diuji daya inhibisinya terhadap enzim alfa amilase dan alfa glukosidase. Diagram alir penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 8.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 8. Diagram alir penelitian

1. Ekstraksi

Teh hitam diblender kering sampai menghasilkan partikel halus (bubuk) yang homogen. Konsentrasi teh hitam dibuat yang sama, yaitu 0.04 g/ml (4 gram teh ditambah dengan 100 ml air). Teh diseduh dengan perlakuan dua suhu dan tiga waktu penyeduhan yang berbeda. Suhu air yang digunakan untuk menyeduh yaitu suhu 70°C dan suhu 100°C atau mendidih. Sedangkan waktu penyeduhan yaitu 5, 15, dan 30 menit. Larutan teh tersebut disaring dengan kain saring, disentrifuse pada 3500 rpm selama 10 menit, dan disaring kembali dengan penyaring vakum menggunakan kertas saring Whatman No. 41. Volume ekstrak kemudian ditepatkan ke volume awal dengan penambahan akuades. Diagram alir proses ekstraksi teh hitam dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Perlakuan pH Simulasi Sistem Pencernaan *In vitro*

Pada percobaan ini, ekstrak teh akan melalui proses pencernaan secara *in vitro* dengan mengubah nilai pH sesuai pH saluran pencernaan, yaitu lambung dan usus halus. Ekstrak teh yang didapat pertama-tama diukur pH nya sehingga didapat pH ekstrak awal. Kemudian ekstrak diubah pH nya sesuai pH lambung yaitu pH 2 dengan menggunakan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

kurang lebih tiga sampai empat tetes HCl 11.96 N dan didiamkan selama 30 menit. Kemudian ekstrak yang pH nya sama dengan pH lambung tersebut diubah kembali mengikuti pH usus halus, yaitu pH 6.8 dengan penambahan NaOH 10 N sebanyak lima sampai tujuh tetes.

3. Pengujian

Pengujian daya inhibisi enzim alfa amilase dan alfa glukosidase hanya dilakukan baik pada ekstrak dengan pH awal maupun pada pH pada usus halus (6.8) setelah melalui pH lambung (pH 2) selama 30 menit. Pengukuran pH dengan pH meter, total fenol, dan kadar tanin juga diukur pada ekstrak awal.

a) **Pengujian inhibisi enzim alfa amilase**

Pada percobaan ini ingin diketahui pengaruh penambahan teh hitam pada masing-masing suhu dan waktu penyeduhan serta proses pencernaan secara *in vitro* terhadap penurunan aktivitas enzim alfa amilase dalam memecah pati sehingga hasilnya adalah penurunan daya cerna pati. Pati dihidrolisis oleh enzim alfa amilase menjadi gula-gula sederhana. Semakin tinggi daya cerna suatu pati berarti semakin banyak pati yang dapat dihidrolisis dalam waktu tertentu yang ditunjukkan oleh semakin banyaknya glukosa dan maltosa yang dihasilkan. Glukosa dan maltosa dapat bereaksi dengan DNS (asam dinitrosalisilat) sehingga kadar keduanya dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm.

b) **Pengujian inhibisi enzim alfa glukosidase**

Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas penghambatan enzim alfa glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* tipe I secara *in vitro*. Pemecahan substrat *p*-nitrofenil-*-D*-glukofiranosida menjadi *p*-nitrofenil berwarna kuning dan glukosa oleh enzim alfa glukosidase. Aktivitas penghambatan enzim diukur berdasarkan jumlah *p*-nitrofenil yang dihasilkan dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm.

c) **Pengujian total fenol**

Analisis total polifenol menggunakan *folin-ciocalteau* yaitu dengan melihat kemampuan mereduksi dari komponen fenol. Standar yang digunakan adalah asam galat. Asam galat merupakan salah satu senyawa asam fenolat terbanyak dalam teh. Prinsip dari metode ini adalah reduksi dari reagen fosfomolibdat (MoO_4^{2-}) dan fosfotungstat (WO_4^{2-}) sehingga terbentuk kompleks warna biru yang dapat terukur secara spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 725 nm.

d) **Pengujian kadar tanin**

Pengukuran kadar tanin secara kuantitatif dilakukan dengan metode gravimetri. Reaksi yang terjadi didasarkan pada kereaktifan struktur flavonoid dari tanin terkondensasi terhadap formaldehida. Hasil reaksi ini akan membentuk endapan sehingga secara kuantitatif dapat diketahui adanya tanin terkondensasi (Ummah 2010). Formaldehida akan menyerang cincin benzena pada katekin (termasuk golongan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

flavonoid) atau tanin terkondensasi untuk membentuk kompleks pada struktur flavonoid yang dapat diendapkan oleh formaldehida (Garro Galvez *et al.* 1996 diacu dalam Kassim *et al.* 2011).

4. Prosedur

a) Inhibisi enzim alfa amilase (Thalapaneni *et al.* 2008)

Larutan enzim alfa amilase yang digunakan adalah enzim *porcine pancreatic amylase* 1 unit/ml. Campuran reaksi terdiri dari blanko, kontrol A, kontrol B, dan sampel. Kemudian campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, larutan pati 1% (b/v) ditambahkan sebanyak 125 µl dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah inkubasi kedua, pereaksi DNS 0.096 M ditambahkan sebanyak 500 µl dan diinkubasi kembali selama 5 menit pada air mendidih. Setelah itu, 5 ml air suling ditambahkan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol positif yang digunakan adalah acarbose 0.5 mg/ml yang diperoleh dari pelarutan 1 tablet Glucobay (50 mg acarbose) dalam 100 ml HCl 2 N.

Buffer natrium fosfat dibuat dari larutan natrium fosfat monobasik 0.02 M ditambah dengan larutan natrium klorida 0.0067 M dengan perbandingan 1:1, kemudian campuran larutan tersebut dinaikkan pH nya menjadi pH 6.9 dengan penambahan NaOH 1 M. Pati 1% (b/v) dibuat dari 1 gram pati kentang *soluble* dilarutkan dengan 100 ml buffer natrium fosfat, kemudian dididihkan selama 15 menit dan setelah dingin ditepatkan ke volume awal dengan penambahan akuades. Pereaksi DNS 0.096 M dibuat dengan melarutkan 1 gram asam 3,5-dinitrosalisilat ke dalam 50 ml akuades yang dididihkan. Larutan DNS tersebut kemudian dicampurkan dengan larutan natrium kalium fosfat, yang dibuat dari 30 gram natrium kalium tartrate dipanaskan bersama-sama dengan 20 ml NaOH 2 M. Volume campuran larutan tersebut kemudian ditepatkan sampai 100 ml dengan penambahan akuades.

Tabel 6 menunjukkan kombinasi jumlah sampel, buffer natrium fosfat, dan enzim yang diberikan pada blanko, kontrol A, kontrol B, dan sampel. Acarbose diberi perlakuan yang sama seperti sampel. Blanko digunakan untuk menghitung gula-gula sederhana awal pada pati yang bukan hasil hidrolisis enzim. Kontrol A digunakan untuk menghitung seluruh gula baik gula awal maupun gula sederhana hasil hidrolisis enzim. Kontrol B bertujuan untuk menghitung gula sederhana awal pada pati dan teh hitam sedangkan sampel bertujuan untuk menghitung gula sederhana awal pada pati dan teh hitam serta gula hasil hidrolisis enzim dengan adanya inhibitor yaitu teh.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Tabel 6. Jumlah larutan pada analisis aktivitas inhibisi alfa amilase

Larutan	Blanko (μl)	Kontrol A (μl)	Kontrol B (μl)	Sampel (μl)
Sampel	-	-	125	125
Buffer natrium fosfat	250	125	125	-
Enzim	-	125	-	125
Pati	125	125	125	125
Pereaksi DNS	500	500	500	500
Air suling	5000	5000	5000	5000

Aktivitas inhibisi ekstrak dihitung menggunakan rumus (1) sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan : A1 = Absorbansi kontrol A – Absorbansi blanko

A2 = Absorbansi sampel – Absorbansi kontrol B

b) **Inhibisi enzim alfa glukosidase (Mayur et al. 2010)**

Enzim alfa glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* tipe I dengan aktivitas 0.2 unit/ml. Campuran reaksi terdiri dari blanko, kontrol A, kontrol B, dan sampel. Kemudian campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit, larutan p-nitrofenil- -D-glukofiranosida 0.0005 M ditambahkan sebanyak 350 μl dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah inkubasi kedua, tambahkan 1400 μl larutan natrium karbonat 0.2 M dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah acarbose 0.5 mg/ml yang diperoleh dari pelarutan 1 tablet Glucobay (50 mg acarbose) dalam 100 ml HCl 2 N.

Buffer kalium fosfat dibuat dari larutan kalium fosfat monobasik 0.1 M (13.609 gram dilarutkan dalam 1 liter akuades) dan dinaikkan pH nya menjadi 6.8 dengan penambahan NaOH 1 M. Substrat p-nitrofenil- -D-glukofiranosida 0.0005 M dibuat dengan menimbang 1.505 mg dan dilarutkan dalam 10 ml akuades dingin. Larutan natrium karbonat 0.2 M dibuat dengan melarutkan 21.198 gram dalam 1 liter akuades.

Tabel 7 menunjukkan kombinasi jumlah sampel, buffer kalium fosfat, dan enzim yang diberikan pada blanko, kontrol A, kontrol B, dan sampel. Acarbose diberi perlakuan yang sama seperti sampel. Blanko digunakan untuk menghitung gula-gula sederhana awal pada substrat yang bukan hasil hidrolisis enzim. Kontrol A digunakan untuk menghitung seluruh gula baik gula awal maupun gula sederhana hasil hidrolisis enzim. Kontrol B bertujuan untuk menghitung gula sederhana awal pada substrat dan teh hitam sedangkan sampel bertujuan untuk menghitung gula sederhana awal pada substrat dan teh hitam serta gula hasil hidrolisis enzim dengan adanya inhibitor yaitu teh.

Tabel 7. Jumlah larutan pada analisis aktivitas inhibisi alfa glukosidase

Larutan	Blanko (μ l)	Kontrol A (μ l)	Kontrol B (μ l)	Sampel (μ l)
Sampel	-	-	140	140
Buffer kalium fosfat	1190	840	1050	700
Enzim	-	350	-	350
Substrat	350	350	350	350
Na ₂ CO ₃	1400	1400	1400	1400

Aktivitas inhibisi ekstrak dihitung menggunakan rumus (2) sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A1-A2}{A1} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan : A1 = Absorbansi kontrol A – Absorbansi blanko

A2 = Absorbansi sampel – Absorbansi kontrol B

c) Uji total fenol (Strycharz dan Shetty 2002 dengan modifikasi diacu dalam Zega 2010)

Larutan standar asam galat dibuat pada berbagai konsentrasi, yaitu 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Pengujian ini menggunakan reagen *folin ciocalteau* 50% dan pereaksi Na₂CO₃ 5%.

Pertama-tama, larutan standar atau ekstrak sebanyak 0.5 ml dilarutkan dalam 0.5 ml etanol 95%, 2.5 ml akuades dan 2.5 ml larutan reagen *folin ciocalteau*. Setelah itu larutan didiamkan selama 5 menit dalam ruang gelap dan kemudian ditambahkan 0.5 ml larutan Na₂CO₃ dan diinkubasi kembali dalam ruang gelap selama 1 jam. Setelah inkubasi, larutan divorteks dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 725 nm.

d) Uji kadar tanin (Nugraha 1999)

Ekstrak teh sebanyak 25 ml atau disetarakan 1 gram sampel teh ditambahkan HCl 32% sebanyak 5 ml. Kemudian tambahkan 10 ml formalin (HCHO) 37% dan panaskan selama 30 menit. Larutan kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui beratnya dan dicuci dengan akuades sampai bebas asam. Endapan yang terbentuk dikeringkan pada suhu 100°C selama 24 jam kemudian ditimbang. Kandungan tanin dari ekstrak dihitung dengan rumus (3) berikut ini:

$$\text{Kadar tanin} = \frac{\text{Berat endapan (g)}}{\text{Sampel teh (g)}} \times 100 \quad (3)$$



Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

5. Analisis Statistik

Data-data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan Dua Faktor. Jika perlakuan memberikan pengaruh yang nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan analisis beda Duncan pada taraf 5% untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan. Uji t-test dua berpasangan digunakan untuk mengetahui pengaruh perbedaan pH terhadap nilai inhibisi enzim amilase.