

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi Penelitian

Serangkaian tahapan penelitian yang terdiri dari tahap preparasi sampai tahap ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Riset Makanan Program Studi Kimia Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) sedangkan untuk analisis menggunakan UPLC-ESI-QTOF dilakukan di Laboratorium sentral Universitas Padjadjaran (UNPAD).

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas (kaca arloji, gelas kimia 250 mL, 600 mL dan 1 L, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 10 mL, labu mulut hisap, labu ukur 10 mL, labu Erlenmeyer 100 mL, pipet volum 5 mL dan 10 mL, cawan petri), neraca analitik Metler Toledo, kertas saring, corong pendek, *tray* plastik untuk proses germinasi, alat germinator dan saringan mesh 100 mesh.

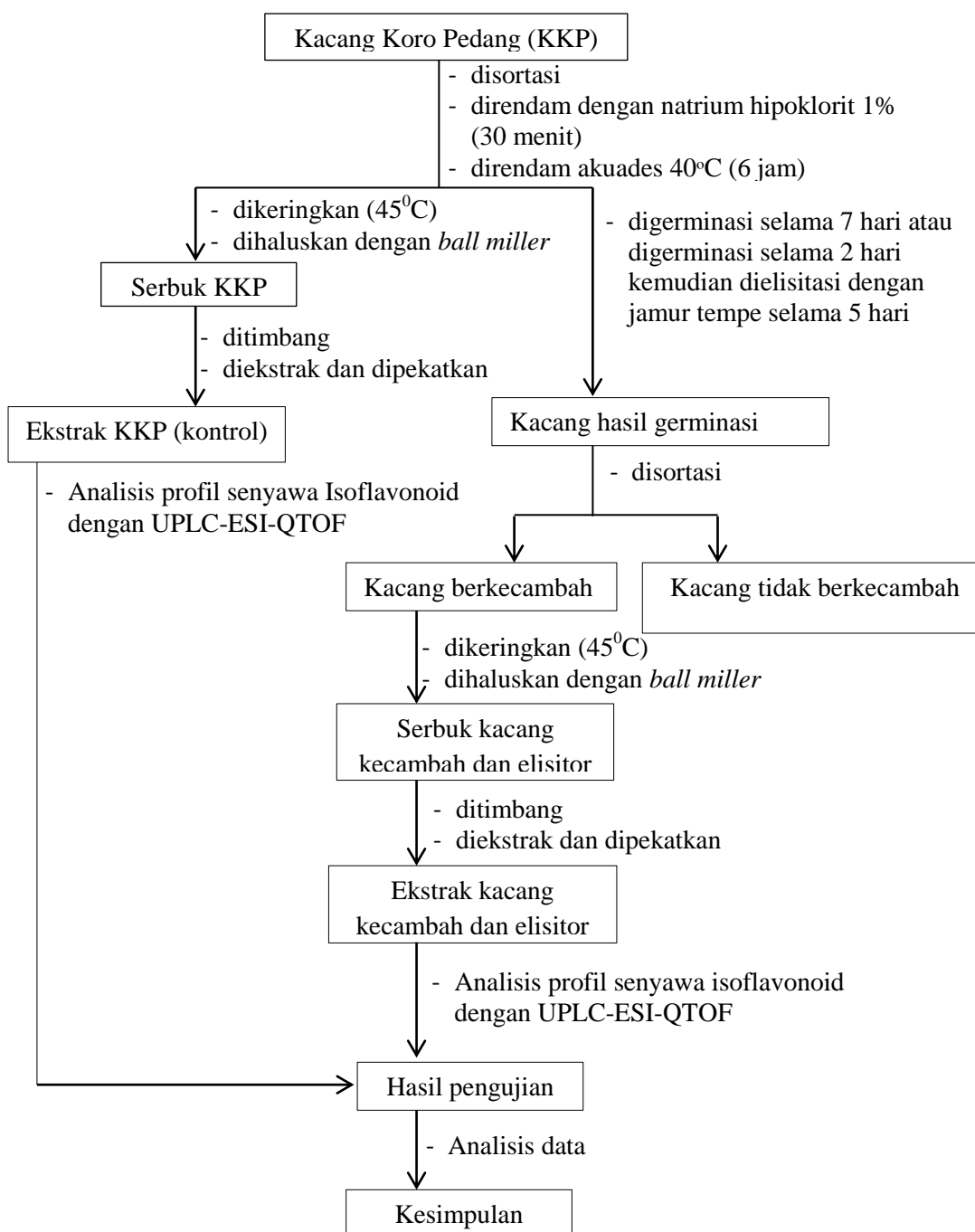
Untuk keperluan ekstraksi dan analisis ekstrak digunakan *ball miller High Energy Milling – Ellipse 3D Motion* (HEM-E3D) (Nanotech Herbal, Indonesia), *ultrasonic cleaner* (Honda W-211, Japan), *centrifuge* (Kokusan H-103n, Japan), *rotatory vacuum evaporator*, *vortex* SciLogex MX-S dan UPLC-ESI-QTOF Xevo-QTOFMS.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.), jamur tempe, natrium hipoklorit (NaOCl) 1%, aquabides pro-injeksi, aquades, kertas saring, n-heksan grade p.a, methanol grade p.a, asetonitril grade p.a, dan asam asetat grade p.a.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap (**Gambar 3.1**). Tahapan tersebut meliputi proses germinasi dan elisitasi kacang, ekstraksi, dan pengujian profil senyawa isoflavonoid. Alur metode penelitian untuk proses germinasi dan elisitasi kacang, ekstraksi, dan pengujian profil senyawa isoflavonoid.



**Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian**

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Tahap Germinasi

##### 3.4.1.1 Alat Germinasi

Germinasi kacang koro pedang dilakukan dalam alat germinasi skala laboratorium yang dibuat dan dioptimasi mengikuti penelitian yang dilakukan oleh Aisyah *et al.*, (2013). Alat ini dapat menampung 200 gram kacang koro pedang. Faktor yang dikontrol dalam alat germinasi ini adalah kelembaban, suhu dan intensitas cahaya. Suhu dalam alat ( $25-30^{\circ}\text{C}$ ) dijaga oleh *heat mat* (*Hyindoor* 12 V) disertai thermostat yang diletakkan di bawah alat. Untuk menjaga kelembaban, kabut air dihasilkan oleh sebuah *fog generator* (24 V) yang diletakkan di dalam wadah berisi air. Hasil optimasi menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk germinasi diperoleh dengan mengatur nyala *humidifier* dan kipas setiap 5 menit per 3 jam untuk proses germinasi dan 2 menit per 5 jam untuk proses elisitasi. Selama *fog generator* menyala, sebuah kipas yang ada di dalam alat bekerja mendistribusikan kabut air ke seluruh area alat germinasi. Untuk menjaga sampel dari cahaya digunakan box germinator berwarna hitam agar tidak ada cahaya yang masuk dari luar. Sebelum digunakan, alat germinasi disterilisasi dengan disemprotkan larutan hipoklorit ( $\text{NaOCl}$ ) 1% (v/v) ke seluruh bagian alat lalu disinari dengan lampu UV C selama 30 menit.



**Gambar 3. 2** Skema Alat Germinator

##### 3.4.1.2 Germinasi

Kacang koro pedang yang digunakan pada penelitian ini diperoleh secara komersial. Kacang koro pedang disortasi terlebih dahulu kemudian disterilasi

berdasarkan metode yang telah dijelaskan sebelumnya oleh Ti *et al.* dengan sedikit modifikasi, menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% sehingga tidak ada pengaruh mikroorganisme selama masa germinasi. Sterilisasi kacang koro pedang dilakukan dengan menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% dilakukan selama 30 menit kemudian dicuci dengan akuades hingga pH netral (Ti *et al.*, 2014), kacang kemudian direndam dalam akuabides pro injeksi selama 6 jam pada suhu 40 °C. Perendaman ditujukan agar kacang koro menyerap cukup air sehingga lebih mudah untuk berkecambah. Hal ini berkaitan dengan aktivitas enzim yang memerlukan media air untuk dapat aktif (Zaks & Klibanov, 1988). Perendaman pada suhu 40°C bertujuan untuk mempermudah kacang koro menyerap air karena kacang koro memiliki kulit yang luar yang cukup tebal. Kacang koro pedang yang telah direndam selanjutnya digunakan untuk tahap germinasi. Selama perendaman dengan larutan natrium hipoklorit dan akuabides tersebut, kacang dibiarkan dalam keadaan gelap sehingga terhindar dari pengaruh cahaya yang ada dilingkungan sekitar.

Germinasi kacang koro pedang dilakukan dengan dua perlakuan yang berbeda: germinasi dalam keadaan gelap (g) dan kombinasi germinasi dan elisitasi menggunakan jamur tempe dalam keadaan gelap (gF) (**Tabel 3.1**). Jamur tempe digunakan karena jamur tempe merupakan jamur *food grade*, dijual secara komersil dan dapat menginduksi senyawa fitoaleksin pada kacang (Feng, *et al.*, 2007). Proses germinasi dan elisitasi berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Aisyah *et al.* (2013) dan Feng *et al.* (2007) dengan sedikit modifikasi. Kacang yang telah direndam digerminasi selama 7 hari pada suhu 25<sup>0</sup>C dan RH 100%. Untuk elisitasi dengan jamur tempe, kacang digerminasi selama 2 hari pada suhu 25<sup>0</sup>C dan RH 100%. Kemudian, suspensi spora (7,5 ml/100g kacang) ditambahkan kedalam kacang, dan kacang diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30<sup>0</sup>C dan RH dikontrol pada 55-85%. Untuk inokulasi jamur, serbuk inokulum tempe (1 gr) disuspensikan dalam 15 mL aquabides untuk mendapatkan suspensi spora. Setelah proses germinasi dan elisitasi dengan jamur tempe selesai, kacang yang berkecambah dan tidak dipisahkan. Kacang yang berkecambah yang telah dipisahkan dikeringkan dalam oven dengan suhu ±45<sup>0</sup>C selama 12 jam hingga kadar airnya sekitar 10%. Kacang yang telah kering dihaluskan menggunakan *ball*

*miller* dengan rasio *ball to sample* 20:1. Hasil penggilingan dengan *ball miller* selanjutnya disaring menggunakan mesh berukuran 100 mesh. Hasil penyaringan bubuk kacang berkecambah disimpan dalam *freezer* untuk proses analisis selanjutnya.

**Tabel 3. 1** Perbedaan Perlakuan Kacang Koro Pedang

Perlakuan				
	Strerilisasi	Perendaman (6 jam)	Germinasi (2 hari)	Inkubasi (5 hari)
<i>Untreated</i>	✓	-	-	-
<i>Ungerminated</i>	✓	✓	-	-
<i>Germinated</i>	✓	✓	✓	✓ (tanpa jamur)
<i>Germinated+</i> <i>elicited</i>	✓	✓	✓	✓ (dengan jamur)

### 3.4.2 Tahap Ekstraksi Kacang Koro Pedang

Ekstraksi kacang dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Aisyah, *et al.* (2016) dengan sedikit modifikasi. Bubuk sampel kacang koro pedang sebanyak 1 gram diekstraksi sebanyak 3 kali dengan n-heksan dan metanol 80%. Pelarut n-heksan digunakan untuk menghilangkan lemak yang terkandung dalam kacang koro pedang agar tidak mempengaruhi saat proses analisis dan pemilihan pelarut metanol dilakukan karena metanol mampu melarutkan senyawa isoflavonoid pada kacang koro (Aisyah *et al.*, 2016). Tahapan ekstraksi yang dilakukan adalah melarutkan bubuk sampel kacang dalam pelarut sebanyak 20 mL, dilakukan ekstraksi menggunakan *ultrasonic vibrator* selama 30 menit. Teknik ini digunakan karena mudah dilakukan dan prosesnya lebih cepat sehingga tidak merusak kandungan yang ada dalam kacang koro pedang. Dinding sel dari bahan dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah (Mason, J. T, 1990). Pemisahan dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit, supernatan yang diperoleh selanjutnya difiltrasi gravitasi menggunakan kertas saring.

Ekstrak yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan menggunakan *rotatory vacuum evaporator*, ekstrak yang didapatkan dimasukkan kedalam labu ukur dan diencerkan kembali menggunakan pelarut metanol 80 % hingga volumenya 10 mL. Ekstrak kacang yang diperoleh dihomogenisasi menggunakan *vortex* selama 2 menit kemudian disimpan dalam *freezer* untuk keperluan analisis dengan UPLC-ESI-QTOF.

### **3.4.3 Tahap Analisis Profil Senyawa Isoflavonoid dan Fitoaleksin menggunakan UPLC-ESI-QTOF**

Ekstrak kacang dianalisis menggunakan instrumen UPLC-ESI-QTOF Xevo-QTOFMS yang terdiri dari bagian kromatografi cair (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) yang dihubungkan dengan spektroskopi massa resolusi tinggi dengan teknik ionisasi *Electrospray Ionization* (ESI) dan penganalisis massa *Quadrupole Time-of-Flight* (Q-TOF) pada mode positif. Kolom yang digunakan adalah C-18 ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (1.7 µm VanGuard™ Pre-column 3/Pk (2.1x5 mm)). Pelarut yang digunakan adalah pelarut A: air yang diasamkan dengan 0.1% asam asetat, pelarut B: asetonitril yang diasamkan dengan 0.1% asam asetat dengan laju alir 300 µL/min. Suhu kolom 35°C, suhu *autosampler* 15°C dan volume sampel 1 µL. Elusi gradient dilakukan sebagai berikut : dari 0-2 menit, gradient linear dari 10-25% pelarut B; dari 2-9 menit, gradient linear dari 25-50% pelarut B; dari 9-12 menit, isokratik pada 50% pelarut B; dari 12-22 menit, gradient linear dari 50-100% pelarut B; dari 22-24 menit, isokratik pada 100% pelarut B; dari 24-25 menit, gradient linear dari 100-10% pelarut B; dan dari 25-30 menit, isokratik pada 10% pelarut B. Mode operasi untuk spektroskopi massa adalah ESI (+); suhu *ion transfer tube* (ITT): 400°C; *source voltage*: 4.50 kV; *collision energy*: 10 eV; *acquisition m/z range*: 150-1000 Da (Aisyah *et al.*, 2016).