

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret hingga bulan Juli 2022 di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Institut Teknologi Bandung untuk melakukan *freeze dry*, serta Laboratorium Riset untuk ekstraksi sampel dan Laboratorium Kimia Instrumen untuk analisis UHPLC-ESI-QTOF di Departemen Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Freeze dry merek Uchen, UHPLC-ESI-QTOF merek Shimadzu tipe LCMS-8050, Neraca Analitik merek Mettler Toledo tipe ME204, mesin penggiling bumbu kering tipe DE-100G, mikro pipet ukuran 100-1000 μL merek DLab, mikro pipet ukuran 1000-5000 μL merek DragonLab, vortex shaker merek Scilogex tipe MX-S, sonikator merek Labocon, Alat sentrifuge merk Kokusan tipe H-103n, micro sentrifuge merek Boeco tipe M-24A, Freezer, Gelas Kimia berukuran 50, 100, 150, 250, dan 500 mL, batang pengaduk, spatula, tabung falcon ukuran 15 dan 50 mL merek NEST, tabung eppendorf berukuran 1,5 mL, rak tabung eppendorf 1,5 mL, ayakan ukuran 80 mesh, labu ukur 500 mL, gelas ukur 100 mL, pipet ukur 5 mL, *syringe filter* ukuran 0,2 μm , syringe, dan *micro insert* ukuran 250 μL .

3.2.2. Bahan

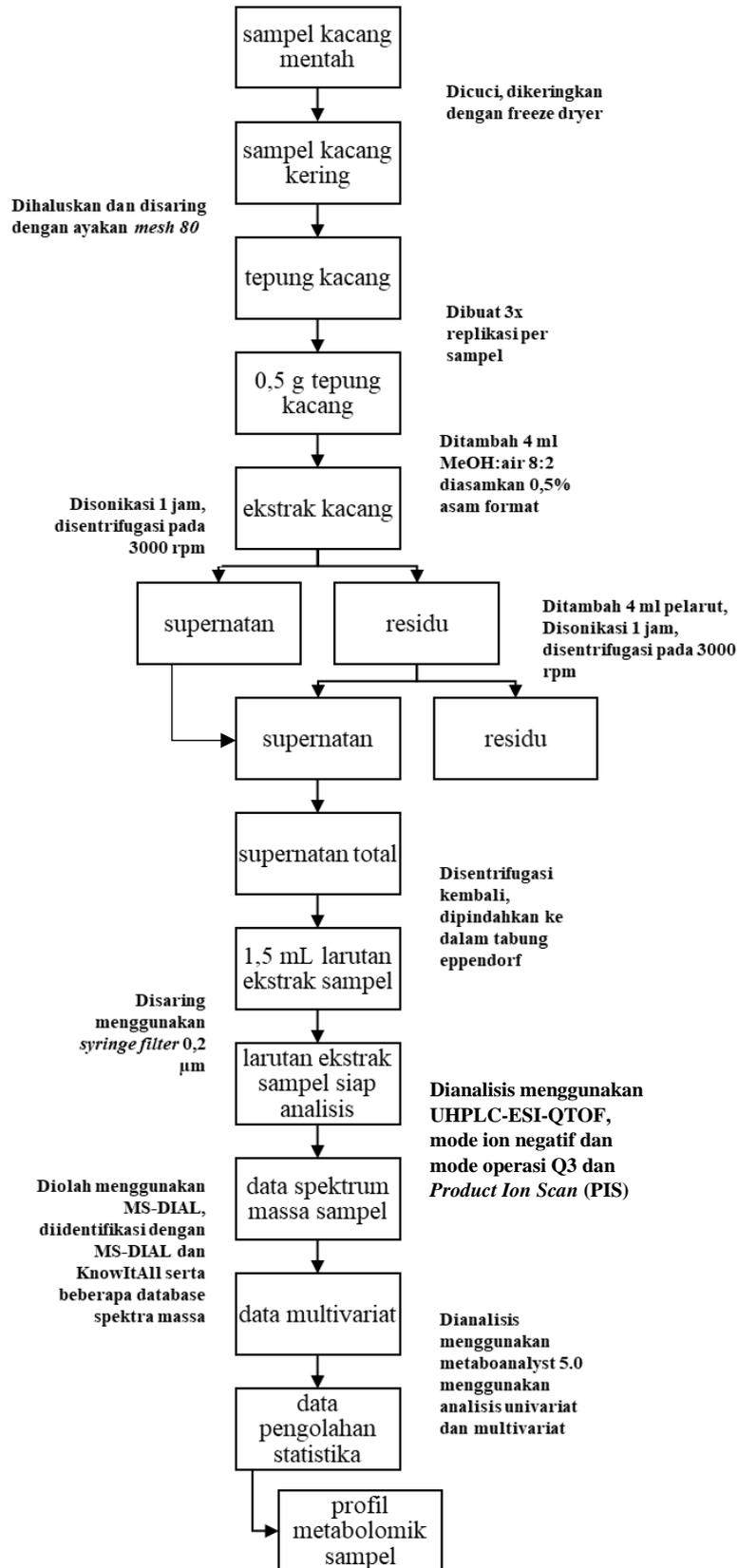
Kacang hijau (*Vigna radiata*), kacang azuki (*Vigna angularis*), kacang panjang hitam (*Vigna unguiculata l.*), kacang kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) aqua bidest (PT. Ikapharmindo Putramas), H₂O grade LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), metanol grade LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), asam format grade LC-MS (Emsure®), dan asetonitril grade LC-MS (LiChrosolv®, Supelco).

3.3. Bagan Alir Penelitian

Penelitian diawali dengan proses pengeringan sampel kacang mentah menggunakan *freeze dry*, selanjutnya sampel yang telah kering dihaluskan menjadi tepung dan diayak menggunakan pengayak berukuran 80 *mesh*. Sampel yang telah diayak ditimbang sebanyak 0.5 gram dan dibuat menjadi 3 sampel per spesi sampel

yang digunakan. Setelah ditimbang, sampel diekstraksi dengan pelarut MeOH:H₂O 80:20 yang diasamkan menggunakan asam format 0,5%. Sampel yang telah ditambahkan pelarut disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 2x7 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan endapan dan larutan hasil ekstraksi. Endapan yang telah dipisahkan dari supernatan hasil ekstraksi selanjutnya ditambahkan kembali 4 ml pelarut MeOH:H₂O 80:20 dan disentrifugasi kembali untuk selanjutnya supernatan yang terbentuk dipisahkan dari endapan dan dicampurkan dengan supernatan hasil ekstraksi sebelumnya. Larutan hasil ekstraksi selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf berukuran 1,5 ml untuk disentrifugasi kembali selama 3x4 menit pada kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C. Setelah disentrifugasi, sampel disaring menggunakan *syringe filter* berukuran 0,2 µM. sebelum dipindahkan ke dalam vial LCMS untuk dianalisis menggunakan instrumen UHPLC-ESI-QTOF. Setelah dianalisis, didapatkan data berupa file berekstensi “.mzML” yang selanjutnya akan digunakan dalam analisis multivariat.

Data “.mzML” yang diperoleh diolah dengan software MS-DIAL untuk didapatkan data spektra MS₂ yang terdeteksi oleh instrumen. identifikasi spektra MS₂ dilakukan menggunakan file “.msp” yang didapatkan dari software MS-DIAL dan dibuka menggunakan software KnowItAll agar dapat diidentifikasi menggunakan database SpectraBase, MoNA dan MassBank. Setelah proses identifikasi spektra MS₂ selesai dilakukan, data luas area tiap spektra MS₂ yang telah diidentifikasi pada seluruh sampel kacang-kacangan diubah menjadi file berekstensi “.csv” sesuai ketentuan file yang diinginkan oleh MetaboAnalyst 5.0 untuk dianalisis data multivariatnya secara kemometrik dan statistika. Secara garis besar, tahapan penelitian dari preparasi sampel hingga pengolahan data dapat dilihat dalam skema bagan alir pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.4. Prosedur Kerja

Metode yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari penelitian yang dilakukan oleh Llorach dkk, pada tahun 2019 dengan beberapa penyesuaian. Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

3.4.1. Pencucian dan Penepungan Kacang

Analisis metabolomik senyawa anti nutrisi akan dilakukan pada empat jenis kacang, yaitu kacang hijau (*Vigna radiata*), kacang azuki (*Vigna angularis*), kacang panjang (*Vigna unguiculata l.*), dan kacang kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) Kacang dicuci terlebih dahulu menggunakan aqua bidest sebanyak 3 kali untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Kemudian kacang dikeringkan dengan metode *freeze drying*. Kacang yang telah kering kemudian digiling halus menggunakan penggiling bumbu kering lalu disaring menggunakan ayakan berukuran 80 mesh.

3.4.2. Ekstraksi Metabolit Sekunder Pada Sampel Kacang

Pada penelitian ini, ekstraksi dilakukan pada sampel kacang dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Sampel kacang yang sudah ditepungkan ditimbang sebanyak 0,5 g per 3 sampel untuk tiap jenis kacang setiap sampel kacang diberi identitas sesuai jenis kacang yang digunakan, seperti KA: kacang azuki, KKE: kacang kecipir, KH: kacang hijau, dan KPH: kacang panjang hitam. Setiap sampel dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga nama sampel menjadi KA1, KA2, KA3, dan seterusnya. Adapun data penimbangan dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Bubuk kacang kemudian ditambahkan 3,5 mL pelarut MeOH / H₂O (80:20) yang telah diasamkan dengan 0,5% asam format yang telah dilakukan optimasi sebelumnya. Adapun perhitungan pembuatan larutan untuk ekstraksi sampel dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Campuran bubuk kacang dengan pelarut kemudian disonikasi selama satu jam untuk mengekstrak komponen metabolit yang terdapat dalam sampel. Setelah diekstraksi, sampel disentrifugasi pada 3000 rpm sebanyak 2 kali masing-masing selama 7 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dipisahkan dari residunya. Ekstraksi kedua dilakukan dengan menambahkan pelarut yang sama pada residu lalu dilakukan kembali sonikasi selama satu jam. Sampel yang telah ditambahkan pelarut kembali disentrifugasi pada 3000 rpm sebanyak 2 kali selama 7 menit. Supernatan yang dihasilkan pada ekstraksi kedua

dicampurkan dengan supernatan hasil ekstraksi pertama. Supernatan hasil ekstraksi disentrifugasi kembali pada 3000 rpm sebanyak 2 kali selama 7 menit. Adapun tahapan ekstraksi ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali untuk setiap sampel. Setelah itu larutan hasil ekstraksi dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf berukuran 1,5 ml untuk selanjutnya disentrifugasi kembali sebanyak 3 kali selama 4 menit pada 3000 rpm pada suhu 4°C. Sebelum dipindahkan ke dalam vial LCMS, larutan hasil ekstraksi disaring terlebih dahulu menggunakan *syringe filter* berukuran 0,2 µm. Setelah dipindahkan ke dalam vial, sampel dimasukkan ke dalam rak sampel yang terdapat pada instrumen UHPLC-ESI-QTOF.

3.4.3. Analisis Metabolomik dengan Instrumen UHPLC-ESI-QTOF

Pada penelitian ini, digunakan instrumen UHPLC-ESI-QTOF yang memiliki detektor Shimadzu LCMS-8045 dengan kolom tipe C18 berspesifikasi 100 x 3.0 mm.I.D (S-1.9 µm, 12 nm). Fasa gerak yang digunakan dalam analisis terdiri atas dua jenis pelarut yaitu air *grade* LCMS dengan 0,1% asam format sebagai fasa gerak A dan asetonitril *grade* LCMS dengan 0,1% asam format sebagai fasa gerak B. Sistem pompa *binary gradient* digunakan dalam analisis LCMS-ESI-QTOF dengan nilai aliran total sebesar 0,3000 mL/menit dan waktu pengerjaan selama 20.01 menit. Konsentrasi fasa gerak B pada 16 menit pertama diatur pada 5%, dan pada menit ke-16 hingga 18 diatur pada 95%. Pada menit ke-18 hingga analisis selesai dilakukan, konsentrasi fasa gerak B kembali diatur pada 5%. Pada alat digunakan *Autosampler* tipe SIL-20ACXR dengan volume pencucian 500 µL dan kecepatan sampling 5 µL/detik. Oven CTO-20AC juga digunakan dalam analisis pada temperatur 40°C dengan temperatur maksimum sebesar 90°C dan *Collision energy (CE)* sebesar 25.0 V serta tekanan maksimal sebesar 660 kgf/cm². Mode analisis yang digunakan adalah mode Q3 scan dan *Product Ion Scan (PIS)* menggunakan 61 *event data acquisition*.

3.4.4. Pengolahan Data dan Analisis Secara Statistik

3.4.4.1. Pengolahan data menggunakan MS-DIAL

Setelah dianalisis menggunakan instrumentasi UHPLC-ESI-QTOF, data hasil analisis disimpan dalam file berekstensi “.mzML”. file tersebut selanjutnya dibuka menggunakan software MS-DIAL 4.90 untuk diolah datanya agar dapat digunakan dalam analisis metabolomik. Adapun pengolahan data menggunakan

software MS-DIAL 4.90 dilakukan menggunakan parameter yang telah dioptimasi sebelumnya langkah kerja yang digunakan dalam pengolahan data pada software MS-DIAL dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

3.4.4.2. Identifikasi Senyawa Menggunakan Database

File msp dari spektra massa yang memiliki nilai MS2 dari hasil ekstraksi data menggunakan MS-DIAL Selanjutnya dibuka menggunakan software KnowItAll. Setelah file tersebut dibuka, dilakukan pencarian spektra menggunakan database SpectraBase yang dimiliki oleh software KnowItAll secara menyeluruh. Spektra yang memiliki kemiripan / *Hit Quality Index* (HQI) dengan spektra sampel di atas 50% digunakan sebagai dasar penamaan senyawa dalam identifikasi menggunakan database SpectraBase. Spektra massa yang tidak memiliki nilai HQI lebih dari 50% selanjutnya diidentifikasi menggunakan database MoNA. Spektra yang memiliki nilai *similarity index* dengan spektra sampel di atas 500 digunakan sebagai dasar penamaan senyawa dalam identifikasi menggunakan database MoNA. Spektra massa yang tidak memiliki nilai *similarity index* lebih dari 500 selanjutnya diidentifikasi menggunakan database MassBank. Spektra yang memiliki nilai *hit score* lebih dari 0,5 digunakan sebagai dasar penamaan senyawa dalam identifikasi menggunakan MassBank. Spektra massa yang tidak dapat diidentifikasi setelah melalui pencarian menggunakan ketiga database akan disisihkan dan tidak digunakan dalam pengolahan data sampel secara statistika dan kemometrik.

3.4.4.3. Pengolahan data menggunakan MetaboAnalyst 5.0

Data yang didapatkan dari pengolahan data menggunakan kedua *perangkat lunak* MS-DIAL dan KnowItAll selanjutnya dimasukkan ke dalam *open source Perangkat lunak* MetaboAnalyst 5.0 dalam bentuk file ekstensi “.csv”. Setelah dimasukkan ke dalam MetaboAnalyst, sampel dinormalisasi terlebih dahulu menggunakan parameter hasil optimasi di bawah ini:

- *Sample normalization: normalization by median*
- *Data transformation: root square transformation*
- *Data scaling: Mean centering*

Setelah data dinormalisasi, seluruh analisis univariat dan multivariat yang dilakukan seperti SAM, PCA, PLS-DA, dan HCA akan dilakukan secara otomatis

oleh MetaboAnalyst dan dapat diunduh pada bagian *download* sebagai file berekstensi “.zip” yang berisi laporan hasil analisis MetaboAnalyst beserta setiap gambar ilustrasi dari operasi statistika dan kemometrik yang dilakukan pada sampel.