

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian analisis metabolomik *untargeted* pada empat kacang-kacangan lokal ini berlangsung dalam kurun waktu kurang lebih empat bulan, mulai dari bulan Maret sampai dengan Juli 2022 dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Institut Teknologi Bandung untuk melakukan pengeringan sampel kacang-kacangan lokal dengan metode *freeze dryer*.
- 2) Laboratorium Riset Kimia Makanan Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan penepungan, penimbangan, dan ekstraksi sampel kacang-kacangan lokal.
- 3) Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan analisis ekstrak kacang-kacangan menggunakan instrumentasi UHPLC-ESI-QTOF.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

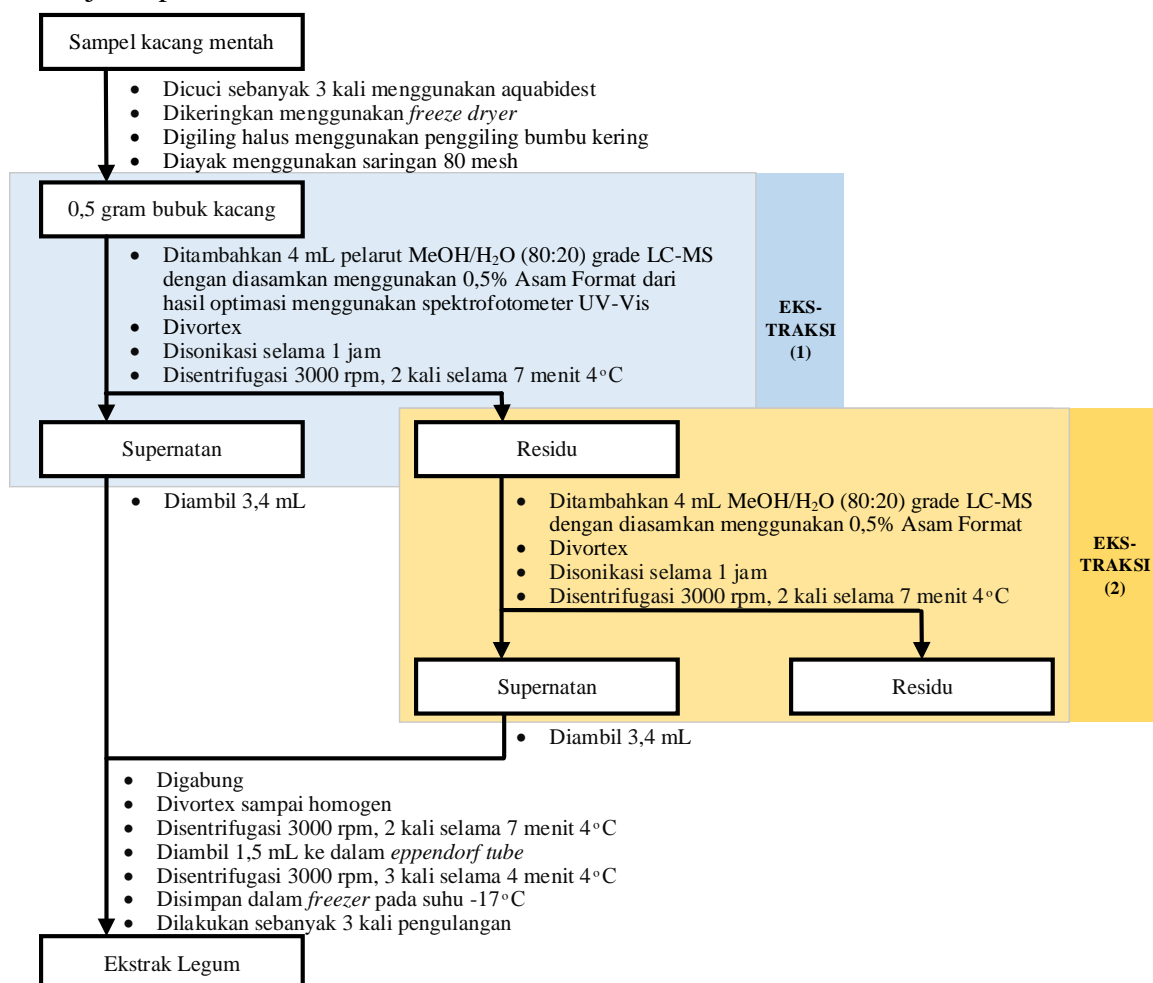
Pada penelitian ini alat yang digunakan dalam proses preparasi dan ekstraksi sampel yaitu gelas kimia (50 mL, 100 mL, 250 mL dan 500 mL), batang pengaduk, spatula, kaca arloji, tabung falcon (15 mL dan 50 mL (Nest)), *freeze dryer* (Uchen), neraca analitik (Mettler Toledo ME204), mesin penggiling bumbu kering (DE-100G), ayakan 80 mesh, nampan *stainless steel*, labu ukur 500 mL, gelas ukur 100 mL, corong kaca, pipet ukur 5 mL, pipet tetes, mikro pipet (100 – 1000  $\mu$ L (DLab) dan 1000 – 5000  $\mu$ L (DragonLab)), *blue tip* mikro pipet 1000  $\mu$ L, *white tip* mikro pipet 5000  $\mu$ L, *ependorf tube* 1,5 mL, rak *ependorf tube* 1,5 mL, vortex (Scilogex MX-S), sonikator (Labocon), sentrifuse (Kokusan H-103n), mikro sentrifuse (Boeco M-24A), *syringe* 1 mL, *syringe filter*, LCMS vial 1,5 mL, *micro-insert* untuk autosampler 250  $\mu$ L, *freezer*, instrumentasi spektrofotometer UV-Vis, dan instrumentasi UHPLC-ESI-QTOF (Shimadzu LCMS-8050).

### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang merah (*P. vulgaris* L. var. Montclan), kacang buncis putih (*P. vulgaris* L. var. T9905), kacang koro benguk (*M. pruriens* L.), dan kacang komak (*L. purpureus*) sebagai sampel yang diperoleh secara komersil, aquabidest (PT. Ikapharmindo Putramas), H<sub>2</sub>O 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 Tahapan Penelitian

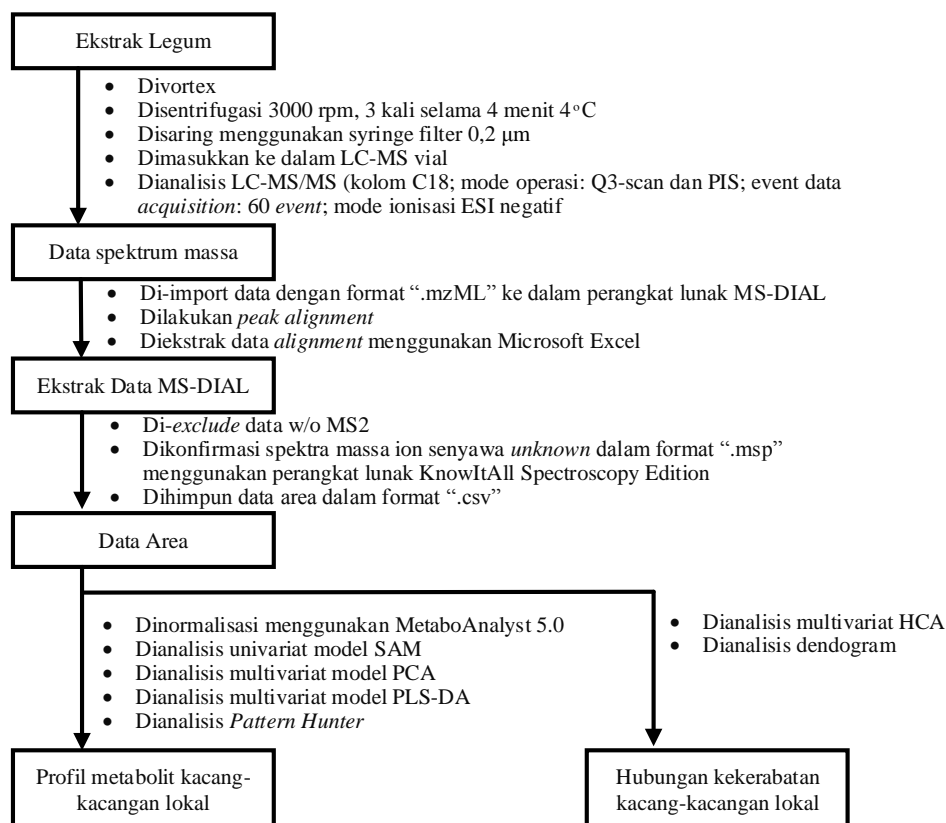
Penelitian ini dilakukan dalam empat tahapan yang dirujuk dari penelitian sebelumnya oleh Llorach et al. (2019) dengan beberapa modifikasi. Tahapan penelitian diawali dengan preparasi sampel kacang-kacangan lokal, ekstraksi sampel, analisis metabolomik menggunakan instrumen UHPLC-ESI-QTOF, serta pengolahan data dan analisis statistik. Bagan alir penelitian pada penelitian ini disajikan pada **Gambar 3.1**.



Shelina Lauren, 2022

ANALISIS METABOLOMIK UNTARGETED PADA KACANG BUNCIS PUTIH, KOMAK, KORO BENGUK, DAN MERAH MENGGUNAKAN INSTRUMENTASI UHPLC-ESI-QTOF

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



**Gambar 3.1** Bagan alir penelitian

### 3.3.1 Preparasi Sampel Kacang-kacangan Lokal

Proses preparasi sampel diawali dengan pencucian kacang menggunakan aquabidest sebanyak 3 kali. Kemudian kacang dikeringkan menggunakan *freeze dryer* pada suhu -60°C selama 24 jam. Kacang yang telah kering kemudian dilakukan penepungan dengan cara digiling halus menggunakan mesin penggiling bumbu kering dengan tujuan untuk menghasilkan permukaan yang lebih kecil dan mengoptimalkan proses ekstraksi selanjutnya. Bubuk kacang hasil penggilingan diayak menggunakan ayakan 80 mesh, kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon 50 mL dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -17°C.

### 3.3.2 Ekstraksi Kacang-kacangan Lokal

Proses ekstraksi sampel kacang diawali dengan penimbangan masing-masing bubuk kacang-kacangan lokal sebanyak 0,5 gram (**Lampiran 1**) lalu dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL. Kemudian masing-masing bubuk kacang ditambahkan pelarut sebanyak 4 mL. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan hasil optimasi menggunakan beberapa pelarut berbeda yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hasil spektrum, pelarut

MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) yang diasamkan dengan 0,5% asam format merupakan pelarut yang optimal sehingga dipilih sebagai pelarut ekstraksi.

Setelah penambahan pelarut, larutan sampel kacang divortex hingga homogen. Selanjutnya larutan sampel dilakukan sonikasi selama satu jam untuk mengekstrak komponen zat aktif. Masing-masing ekstrak sampel disentrifugasi pada 3000 rpm selama 7 menit pada suhu ruangan sebanyak 2 kali sehingga menghasilkan supernatan dan residu. Supernatan yang terbentuk dari hasil sentrifugasi diambil sebanyak 3,4 mL dan dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL, sedangkan residunya digunakan untuk melakukan ekstraksi kedua.

Ekstraksi kedua dilakukan dengan menambahkan pelarut yang sama pada residu, kemudian divortex, disonikasi selama satu jam, dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 7 menit pada suhu ruangan sebanyak 2 kali, sehingga diperoleh supernatan dan residu dari ekstraksi kedua. Supernatan yang dihasilkan dari ekstraksi kedua diambil sebanyak 3,4 mL dan digabungkan dengan supernatan hasil ekstraksi pertama.

Gabungan supernatan tersebut divortex hingga homogen dan disentrifugasi kembali pada 3000 rpm selama 7 menit sebanyak 2 kali. Kemudian diambil sebanyak 1,5 mL dan dimasukkan ke dalam *ependorf tube*. Selanjutnya ekstrak sampel divortex hingga homogen dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 4 menit pada suhu ruangan sebanyak 3 kali. Ekstrak sampel disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -17°C. Setiap sampel dilakukan ekstraksi sebanyak tiga kali pengulangan.

### 3.3.3 Analisis Metabolomik *Untargeted* Menggunakan UHPLC-ESI-QTOF

Terhadap ekstrak sampel kacang dilakukan vortex sampai homogen, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 4 menit pada suhu ruangan sebanyak 3 kali. Selanjutnya disaring menggunakan *syringe filter* 0,2 µm dan diambil sebanyak 200 µL ke dalam vial LC-MS/MS, lalu dilakukan analisis UHPLC-ESI-QTOF Shimadzu LCMS-8050. Kolom yang digunakan C-18 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 Å, 1,8 µm, 2,1 mm x 30 mm, Waters). Fase gerak yang digunakan terdiri dari pelarut A: (air *grade* LC-MS + 1% asam format *grade* LC-MS) dan pelarut B: (asetonitri *grade* LC-MS + 1% asam format *grade* LC-MS) yang dibuat berdasarkan perhitungan pada **Lampiran 3**, dengan laju alir diatur sebesar 0,3 mL/min. Pompa LC-20ADXR digunakan dalam mode gradien biner.

Profil pelarut yang digunakan yaitu 0,10 - 1,01 min, isokratik 5% B; 1,01 - 16,00 min gradien 5% - 95% B; 16,00 - 18,00 min isokratik 95% B; 18,00 - 20,00 min gradien 95% - 5% B. Suhu kolom diatur sebesar 40°C dan volume sampel diinjeksikan sebanyak 5 µL. Mode PIS digunakan untuk analisa ekstrak sampel. Sebanyak 60 event data *acquisition* pada **Tabel 3.1** diimplementasikan dalam mode ionisasi ESI negatif. *Collision energy* (CE): 25 V; *acquisition range*: 50 - 1500 Da; kecepatan *scan*: 1.500 µ/sec.

**Tabel 3.1** Daftar event data *acquisition* mode PIS

Event	Ion Prekursor (m/z)	Event	Ion Prekursor (m/z)	Event	Ion Prekursor (m/z)	Event	Ion Prekursor (m/z)
1	(Q3 scan)	17	228,11	33	456,15	49	301,00
2	73,00	18	229,20	34	521,20	50	405,10
3	84,04	19	253,05	35	549,09	51	558,30
4	87,09	20	269,07	36	578,36	52	608,37
5	87,10	21	275,11	37	625,30	53	668,40
6	101,11	22	280,11	38	658,40	54	807,40
7	102,00	23	285,04	39	660,86	55	323,10
8	119,04	24	299,06	40	794,45	56	173,00
9	125,02	25	303,09	41	810,44	57	176,13
10	137,02	26	304,08	42	862,43	58	499,50
11	143,88	27	304,11	43	865,20	59	725,80
12	147,05	28	321,02	44	909,10	60	787,10
13	169,01	29	379,10	45	937,09	61	919,00
14	185,01	30	405,12	46	940,50		
15	197,05	31	413,00	47	1003,49		
16	225,10	32	418,39	48	1075,20		

### 3.3.4 Pengolahan Data dan Analisis Statistik

Spektrum massa hasil analisis menggunakan instrumen UHPLC-ESI-QTOF dalam format “.mzML” kemudian dilakukan *peak alignment* menggunakan *open-source software* MS-DIAL. Analisis parameter *setting* pada perangkat lunak MS-DIAL diatur berdasarkan hasil optimasi sebagai berikut: *data collection* (MS1 *tolerance*: 0,05 Da dan MS2 *tolerance*: 0,1 Da); *peak detection* (*max. peak height*: 1000 amplitud dan *mass slice width*: 0,09 Da); MS2Dec (*sigma window value*: 0,5 dan MS/MS *abundance cut off*: 25 amplitud); *identification* (*accurate mass tolerance* MS1: 0,05 dan *accurate mass tolerance* MS2: 0,1, dan *identification*

*score cut off*: 40%); dan *alignment* (MS1 *tolerance*: 0,015). Data hasil *alignment* diekstrak menggunakan Microsoft Excel, kemudian dilakukan *exclude* data w/o MS2 dan senyawa *unknown* yang terdeteksi dikonfirmasi berdasarkan spektra massanya menggunakan perangkat lunak KnowItAll Spectroscopy Edition dengan format data “.msp”. Selanjutnya dipilih senyawa yang memiliki nilai HQI pada rentang 60,69% - 93,60% sebagai senyawa *unknown* yang telah teridentifikasi.

Seluruh senyawa yang teridentifikasi dihimpun data area untuk analisis statistik menggunakan MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) dengan format “.csv”, kemudian dilakukan normalisasi berdasarkan nilai median, transformasi data diubah log, dan skala pareto dipilih. Analisis univariat *Significance Analysis of Microarray (and Metabolites)* (SAM) dilakukan dengan nilai Delta 0,3. Kemudian analisis multivariat antara lain *Principal Component Analysis* (PCA), *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA), dan *Hierarchical Clustering Analysis* (HCA) dilakukan dua arah. HCA dianalisis menggunakan korelasi Euclidean dan metode kluster Ward.