



**PROGRAM STUDI KIMIA
UNIVERSITAS MA CHUNG**

Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151, Jawa Timur

Modul Metabolomik Pangan

SKI 4110

NAMA :

NIM :

Jadwal Praktikum:

- Ruang Laboratorium MRCP.
- Semester 7 dengan jumlah 3/3 (sks/js).
- Harus datang 5 menit di lab sebelum jam mulai – kalau tidak maka tidak diperkenankan masuk.
- Prasyarat: Lulus dalam Praktikum Analisis Instrumentasi 2, Mata kuliah Kimia Bahan Alam, Praktikum Kimia Bahan Alam, Mata kuliah Analisis Pangan dan Mata kuliah Kimia Pangan.

SIANG

14:40 – 16:20

- Absensi dan diskusi
- Sesi Eksperimen
- Sesi Penutup

Tim Penyusun Modul dan Pengampu Matakuliah:

1. Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
2. Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.

LEMBAR PENGESAHAN


No. Dokumen : 004
Revisi : -
Mata Kuliah Praktikum : Metabolomik Pangan
Kode Mata Kuliah Praktikum : SKI 4110
SKS : 3
Program Studi : Kimia
Semester : 7 (tujuh)

Tim Penyusun:

Tatas H.P. Brotosudarmo, S.Si., Dipl.Chem., Ph.D.
Heriyanto, S.Si., M.Si., M.Sc.

Malang, 09 Januari 2017

Menyetujui,
Ketua Program Studi Kimia



Dr. Yuyun Yuniati, ST, MT
20140008

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi



Rudy Setiawan, S.Si., MT
20080042

Daftar isi

Lembar Pengesahan.....	i
Daftar isi	ii
Kata Pengantar	iii
BAB 1 Pengenalan Metabolomik.....	1
Konsep metabolomik	1
Pendekatan analisa metabolomik.....	2
Langkah-langkah analisa metabolomik.....	3
<i>Sampling dan Ekstraksi</i>	4
<i>Derivatisasi</i>	5
<i>Separasi dan deteksi GC-MS</i>	5
<i>Identifikasi dan kuantifikasi metabolit</i>	5
Analisa data metabolomik	6
Bab 2 Praktikum Analisa Pengaruh Komposisi Metabolit (Pigmen dan Senyawa Volatil) terhadap Aroma pada Tiga Jenis Teh (Hijau, Oolong, Hitam).....	8
Abstrak.....	8
Pendahuluan	8
Metode.....	8
<i>Sampel</i>	8
<i>Metode KCKT</i>	9
<i>Analisis HS-SPME</i>	9
<i>Analisis GC-MS</i>	9
<i>Analisis Sensori</i>	9
Tugas Praktikum.....	9
Bab 3 Praktikum Identifikasi Kandungan Kafein Kopi Arabika (Coffea Sp.) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) serta Pengelompokan Karakteristik dengan Principle Correlation Analysis (PCA).....	11
Abstrak.....	11
Pendahuluan	11
Metode.....	12
<i>Sampel</i>	12
<i>Penyiapan Sampel</i>	12
<i>Kromatografi Cair</i>	12
<i>Analisa GC-MS</i>	12
<i>Pengujian Organoleptik</i>	12
Tugas Praktikum.....	13
Daftar Pustaka	14

Kata Pengantar

Mata kuliah metabolomik pangan merupakan gabungan antara perkuliahan dan praktikum yang dirancang untuk membekali mahasiswa mengenai analisis kualitatif dan kuantitatif dari semua molekul atau senyawa metabolit dengan ukuran kecil yang terdapat pada bahan dan produk pangan. Asam amino, asam lemak, senyawa volatil, klorofil dan karotenoid, asam organik, gula dan lainnya merupakan senyawa metabolit yang dapat dianalisis menggunakan metode spektroskopi dan kromatografi.

Capaian pembelajaran mata kuliah (CPMK) metabolomik pangan adalah Melakukan studi pustaka dan analisa (Psikomotorik 4) kualitatif dan kuantitatif senyawa metabolit dari produk dan bahan pangan menggunakan metode (Kognitif 3) spektroskopi dan kromatografi serta menyajikannya (Afektif 4) secara berkelompok dan bertanggung jawab. Sedangkan sub-CPMK terdiri dari:

1. Mahasiswa mengetahui pokok bahasan dan mendapatkan pustaka acuan studi metabolomik dari bahan dan produk pangan (P1).
2. Mahasiswa mengetahui dan memahami analisa kualitatif dan kuantitatif senyawa metabolit berdasarkan studi pustaka (P2, P3, PD 2, PD3).
3. Mahasiswa memahami dan mengetahui cara membuat rencana penelitian studi metabolomik dari bahan pangan (P1, P2, KU1, PD 2).
4. Mahasiswa memahami dan mengetahui cara melakukan penelitian studi metabolomik dari bahan dan produk pangan menggunakan metode spektroskopi dan kromatografi (KU3, KK2).
5. Mahasiswa memahami cara analisa data dan membuat laporan hasil penelitian studi metabolomik dari bahan dan produk pangan menggunakan metode spektroskopi dan kromatografi (KU2, KK1, K 3, PD3).

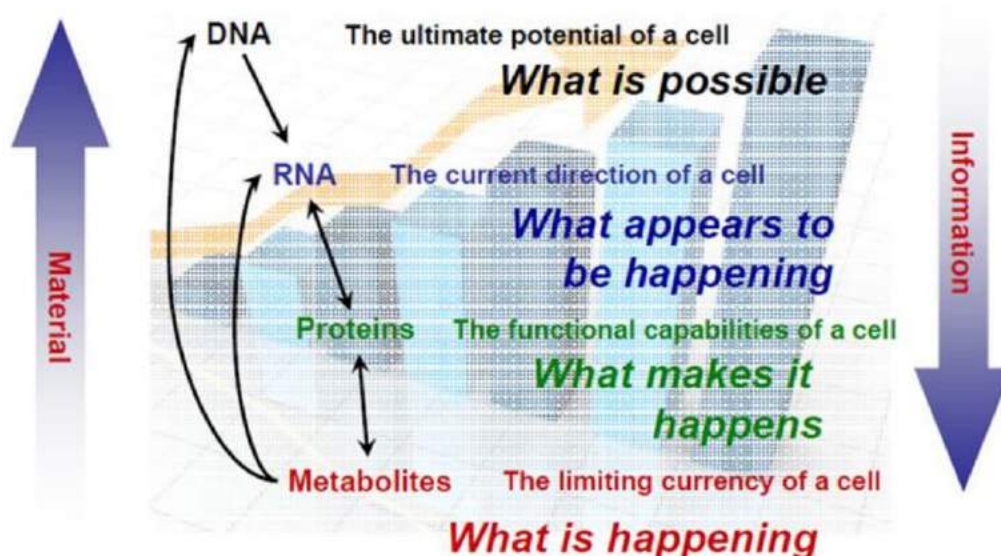
Modul ini dirancang secara khusus sebagai pengangan dalam praktikum, dimana praktikum dirancang berkelompok dan mengarah pada mini-riset.

Malang, 20 April 2018

BAB 1 Pengenalan Metabolomik

Konsep metabolomik

Definisi langsung dari metabolomik adalah suatu metode analisis kinerja tinggi (*high-throughput*) dari senyawa-senyawa metabolit, baik metabolit primer maupun sekunder. Dengan demikian analisis metabolomik memberikan informasi kepada kita suatu gambaran atau peta tentang senyawa kimia mana yang ada pada tingkat relatif pada suatu titik waktu tertentu. Secara umum, metabolomik mengacu pada pendekatan analitik holistik untuk metabolisme yang tidak dipandu oleh hipotesis tertentu. Sebaliknya, metabolomik menetapkan untuk menentukan bagaimana (pada prinsipnya, semua) tingkat metabolit merespon perubahan genetik atau lingkungan dan, dari data, untuk menghasilkan suatu hipotesis baru. Hal ini seperti diilustrasikan pada gambar 1, dimana senyawa metabolit tersebut akan menghasilkan informasi terkait dengan apakah yang terjadi dalam suatu sel atau suatu bahan makanan (khususnya terkait dengan mata kuliah pangan ini).



Gambar 1. Ilustrasi terkait hipotesis terkait material (senyawa metabolit, protein, RNA dan DNA) dengan hipotesis informasi yang dikaitkan dengan keberadaan dari material.

Pengukuran Metabolit telah dilakukan selama beberapa dekade karena (1) pentingnya pengaturan mendasar dari metabolit sebagai komponen jalur biokimia, (2) pentingnya metabolit tertentu dalam diet manusia dan (3) penggunaannya sebagai penanda diagnostik untuk berbagai kondisi biologis, termasuk - penyakit dan respons terhadap pengobatan kimia (Ferne dkk, 2004). Sedangkan dalam bidang pangan, pengukuran metabolit sangat penting karena senyawa metabolit seperti asam amino, gula, lipid serta senyawa lainnya memberikan pengaruh terhadap citra rasa, aroma, kontaminasi pada bahan makanan misalnya senyawa pestisida atau insektisida yang tertinggal, hingga menjadi faktor pembeda dalam suatu inovasi produk makanan.

Secara historis, pengukuran metabolit sebagian besar telah dicapai oleh uji spektrofotometri yang dapat mendeteksi metabolit tunggal, atau dengan pemisahan kromatografi sederhana dari campuran kompleksitas rendah. Selama dekade terakhir, metode yang menawarkan akurasi dan sensitivitas tinggi untuk pengukuran campuran senyawa yang sangat kompleks telah ditetapkan. Metode-metode tersebut termasuk GC-MS, spektrometri massa

kromatografi cair (LC-MS), spektrofotometri massa elektroforesis kapiler (CE-MS) dan transformasi Fourier transform in cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS). Disamping itu terdapat juga metode yang menggunakan NMR yang terkoneksi langsung dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Dalam modul metabolomik pangan ini, kita akan fokus bekerja dengan GC-MS. GC-MS memfasilitasi identifikasi dan kuantifikasi kuat dari ratusan metabolit dalam ekstrak suatu sampel pangan, misalnya daun teh atau biji kopi. Metode dengan GC-MS menghasilkan cakupan analisa yang cukup komprehensif dari jalur pusat metabolisme primer. Kelebihan utama dari teknologi ini adalah bahwa ia telah lama digunakan untuk pembuatan profil metabolit dan oleh karena itu ada protokol stabil untuk pengaturan dan perawatan mesin, serta evaluasi dan interpretasi kromogram. Seperti anda ingat dari praktikum Analisis Instrumentasi 2, bahwa saat melakukan analisa kromatogram GC-MS anda dapat melakukan pencarian suatu senyawa dengan basis data yang terkoneksi langsung oleh internet.

Meskipun tidak ada sistem analitik tunggal yang dapat mencakup seluruh senyawa metabolit, Dalam metabolomik pangan, teknik GC-MS sangat cocok karena memiliki cakupan relatif luas terhadap kelas senyawa yang memiliki berat molekul yang kecil (50 – 800 Da) yaitu metabolit primer, termasuk gula, alkohol gula, asam organik, asam amino, beberapa metabolit sekunder dan vitamin. Eksperimen pemulihan semua kelas senyawa yang dapat diukur telah dilakukan selama validasi metode. Untuk senyawa yang tidak diketahui, tingkat pemulihan dapat ditentukan dengan percobaan rekombinasi di mana ekstrak dua sampel yang memiliki kedekatan (misalnya dua daun teh dari spesies berbeda tapi dalam satu genus) dievaluasi secara independen dan setelah pencampuran.

Pendekatan analisa metabolomik

Ada kurang lebih lima (5) metode analisa metabolomik yang digunakan saat ini:

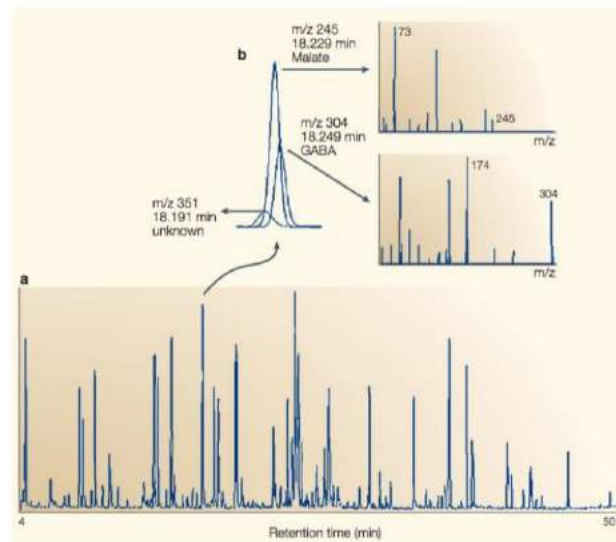
1. Targeted metabolite analysis
2. Multitargeted metabolite analysis
3. Metabolite profiling
4. Metabolite fingerprinting
5. Comprehensive metabolomics

Namun pada modul pembelajaran kita ini berfokus pada *Targeted Metabolite Analysis*. Apakah artinya? Analisa metabolit tertarget artinya adalah kita sudah mengetahui senyawa metabolit yang kita akan analisa. Oleh sebab itu namanya tertarget. Jadi kita tahu senyawa target yang dianalisa. Hal ini mudah karena dalam basis data GC-MS kita telah tersimpan data-data kromatogram dan spektrum MS dari senyawa-senyawa metabolit tersebut.

Jadi, metabolomik yang ditargetkan adalah pengukuran kelompok-kelompok yang didefinisikan dari metabolit yang telah dikarakterisasi secara kimiawi dan biokimiawi (Roberts dkk, 2012). Melalui penggunaan standar internal, analisis dapat dilakukan dengan cara kuantitatif atau semi-kuantitatif. Pendekatan ini mengambil keuntungan dari pemahaman komprehensif dari sejumlah besar enzim metabolik, kinetika mereka, produk akhir, dan jalur biokimia yang dikenal yang telah terdaftar dalam basis data.

Ketika melakukan preparasi sampel dalam analisa metabolit yang ditargetkan, maka protokol tersebut dapat dioptimalkan, mengurangi dominasi molekul dengan kelimpahan tinggi dalam analisis; Selain itu, karena semua spesies yang dianalisis didefinisikan dengan jelas, artefak

analitik tidak dibawa ke analisis hilir. Ketika daftar analit yang telah ditentukan dipelajari, asosiasi baru antara metabolit dapat diterangi dalam konteks keadaan fisiologis spesifik. Teknologi GC-MS pada saat ini memberikan kepada kita data yang sangat besar. Kalau dalam tumbuhan tingkat tinggi saja terdapat ratusan ribu senyawa metabolit, maka kalau dengan menggunakan GC-MS kita akan mendapat data sejumlah kisaran 100-500 senyawa itu masih dalam kategori yang sangat sedikit. Sehingga anda perlu peka kalau file yang anda punyai akan sekitar 20 MB. Besarnya informasi tersebut menjadi tantangan bagi anda untuk mengolah data yang ada.



Gambar 2. Contoh profil kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) dari suatu sampel pangan yang mengandung data intensitas massa dari 300-500 analit dalam file sebesar 20 megabytes (Ferne dkk, 2004).

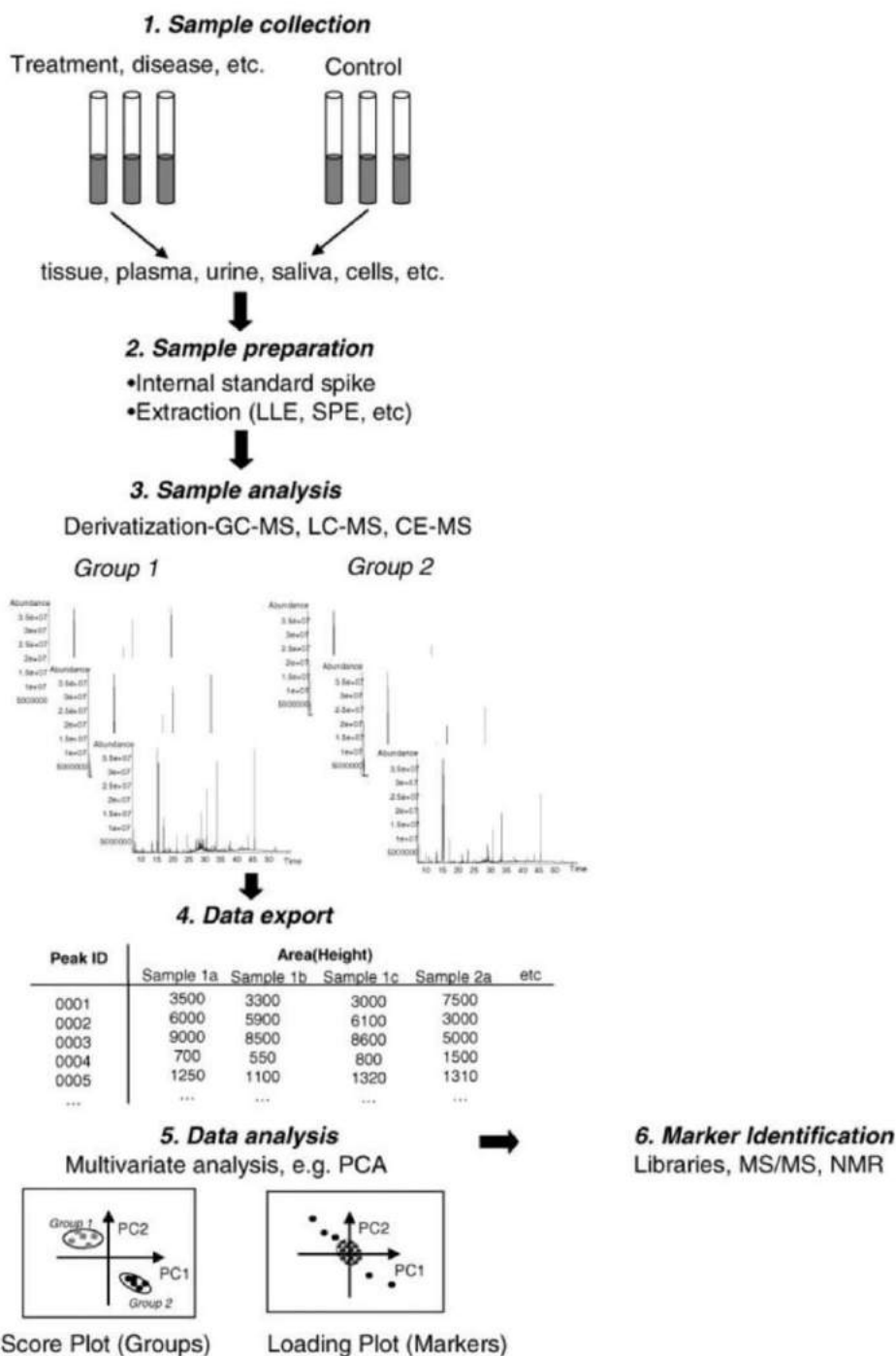
Dengan besarnya data yang perlu dianalisa, maka statistika memegang peran penting dalam metode analisis metabolomik.

Langkah-langkah analisa metabolomik

Berikut adalah tahapan dalam analisa metabolomik:

1. Sampling
2. Ekstraksi
3. Partisi fase
4. Konsentrasi
5. Derivatisasi
6. Injeksi ke sistem GC-MS
7. Kromatografi GC-MS
8. Ionisasi GC-MS
9. Fragmentasi GC-MS
10. Deteksi GC-MS
11. Identifikasi metabolit
12. Kuantifikasi metabolit

Langkah 1-5 kita kenal sebagai penyiapan sampel, sedangkan 6-7 adalah separasi yang terjadi dalam GC, langkah 8-10 adalah deteksi dalam MS, dan yang terakhir langkah 11 dan 12 adalah tahap evaluasi dan kuantifikasi



Gambar 3. Tahapan dalam analisa metabolomik berdasarkan Dettmer dkk (2007)

Sampling dan Ekstraksi

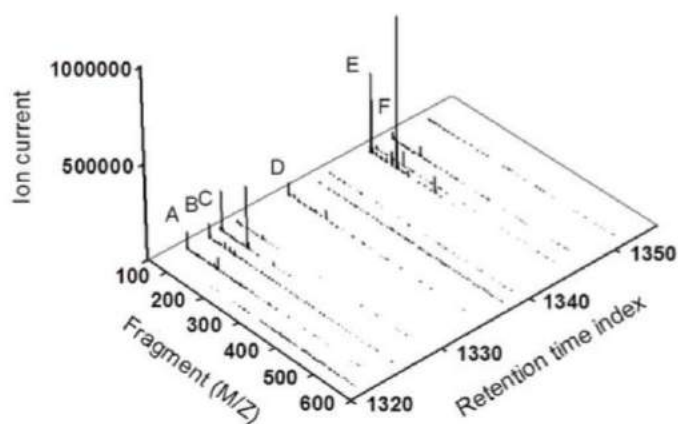
Persyaratan dalam sampling dan ekstraksi antara lain telah dijelaskan dalam mata kuliah Analisis Instrumentasi, namun yang kami ingin garis bawahi dalam modul ini adalah persyaratan kecepatan dalam menon-aktifkan enzim-enzim metabolit sehingga menghindari adanya konversi metabolit saat proses ekstraksi berlangsung. Kemudian syarat ekstraksi harus komplit hingga semua senyawa metabolit terangkat. Yang terakhir dan sangat penting adalah diperkayanya senyawa metabolit target, khususnya apabila anda ekspektasi bahwa senyawa target dalam sampel sangat sedikit.

Derivatisasi

Untuk dapat mendeteksi senyawa metabolit dengan GC-MS maka senyawa tersebut harus volatil dan dalam konformasi fisik yang tunggal, atau tidak terikat dengan senyawa tertentu. Inilah tujuan dari derivatisasi sehingga senyawa benar-benar “mandiri” terdeteksi dalam GC-MS. Contoh derivatisasi misalnya penambahan *phenyl isothiocyanate* (PICT) untuk derivatisasi asam amino. Untuk mendapatkan cakupan luas senyawa metabolit oleh GC-MS, prosedur derivatisasi dua langkah termasuk *methoximation* diikuti oleh sililasi sering digunakan untuk fingerprinting metabolik oleh GC-MS. Proses sililasi biasanya ditambahkan TMS (*trimethylsilyl*) untuk menambah volatilitas. Beberapa eksperimen menggunakan *methoximation* dan mempelajari pengaruh suhu oksidasi dan waktu yang diikuti oleh sililasi dengan MSTFA dengan trimethylchlorosilane 1% (TMCS) dan variasi suhu sililasi, jumlah reagen, dan penambahan ko-solven (heksana, asetonitril). Beberapa eksperimen menemukan *methoximation* dengan methoxyamine dalam pyridine selama 17 jam pada suhu kamar, diikuti dengan sililasi dengan MSTFA selama 1 jam pada suhu kamar menjadi prosedur derivatisasi optimal (Dettmer dkk, 2007).

Separasi dan deteksi GC-MS

Hal yang perlu diperhatikan dalam separasi dan deteksi GC-MS misalnya jenis kolom, gas fase gerak, temperatur, hingga voltase tegangan untuk ionisasi elektron. Detail akan diberikan pada protokol. Biasanya kita akan menggunakan metode MRM dalam analisa metabolomik. Data yang dihasilkan dari separasi dan deteksi GC-MS dapat diilustrasikan pada gambar 4 secara tiga dimensi. Dalam melakukan deteksi GC-MS perlu diperhatikan agar waktu retensi tidak terjadi perubahan. Biasanya kita menggunakan standar FAME (Fatty Acid Methyl Ester) C8-C22 sebagai referensi.



Gambar 4. Data yang akan dihasilkan dari analisa metabolomik dalam 3D.

Identifikasi dan kuantifikasi metabolit

Identifikasi dari metabolit dapat dilakukan dengan melakukan pencarian otomatis dalam basis data yang telah terkoneksi pada komputer GC-MS kita di laboratorium dimana terdapat database dari Shimadzu. Dapat juga dilakukan penelusuran pada beberapa basis data yang tersedia sebagai berikut:

1. NIST (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>)
2. FiehnLib (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/Metabolite-Library-2007/>)
3. Golm metabolic database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>)
4. Mass Bank (<http://www.massbank.jp/index.html?lang=en>)
5. Flavonoid viewer (<http://www.metabolome.jp/software/FlavonoidViewer/data/mass>)
6. LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/index.html>)

Variables (m/z)

Objects (samples)

row.names	85.02867535	85.04812685	86.03200066	86.060363	86.09659861	86.99289159	87.04437142	87.05551116	87.06353237
X20100920_11_AC_30	15.506157	0.74182518	0.6921877	5.370489	1.2064842	5.491629462	9.674862	1.40180223	0.4158399
X20100920_47_AC_54	15.157152	0.93265191	0.7593487	3.798822	0.9618451	6.503842372	6.366602	1.71769076	0.2881482
X20100917_15_NOR_30	16.375372	0.58056653	0.7405717	7.138574	1.4357149	5.425450082	12.737057	0.95402230	0.4449065
X20100920_64_NOR_49	18.477925	0.80804812	0.8726308	4.743568	1.0756890	5.868078071	8.566578	1.68399379	0.4809376
X20100917_57_NOR_49	15.762851	0.56280899	0.6930968	4.884333	0.5744624	2.593798996	8.698681	1.22498882	0.1215892
X20100917_63_AC_40	19.536413	0.64521509	0.8932088	7.651749	0.5174646	10.398189262	12.884521	1.39416892	0.5455830
X20100920_86_CNR_25	18.593834	0.41586627	0.8442614	7.822921	0.3835749	8.819885138	12.114758	0.63710216	0.5436288
X20100917_60_RIN_49	18.351163	0.64216709	0.8988681	5.866678	1.0318843	4.412544513	10.356847	1.18170686	0.3557551
X20100921_11_AC_20	13.248275	0.71741791	0.6292936	6.653956	2.6753299	7.835304659	12.382572	0.95315835	0.3919214
X20100917_20_AC_52	20.818549	0.52585407	1.0038818	3.292031	0.4368519	5.517587684	5.637388	1.18339989	0.3223558
X20100921_60_CNR_40	19.361681	0.33245938	0.8999786	4.788526	0.4928936	7.832831358	8.593449	0.48339447	0.5449337
X20100920_33_CNR_20	15.766320	0.48723240	0.7254843	7.788746	2.0423227	9.097518700	13.916318	0.46799541	0.4909746
X20100917_84_AC_53	17.228356	0.64617877	0.8358225	4.558736	0.7396387	7.094692825	7.962826	1.47121298	0.3217715
X20100921_35_AC_15	9.099162	0.63347865	0.3985374	7.603451	1.1537385	7.715451754	13.225294	0.49742452	0.4055616
X20100917_85_RIN_53	19.118243	0.72518414	0.9771563	3.883035	1.2589184	5.789768841	6.878934	1.68578865	0.3934081
X20100920_12_RIN_30	15.879683	0.66735232	0.7217823	7.878826	1.2114839	5.099457599	14.834617	1.18819566	0.4834576
X20100917_26_CNR_54	17.378201	0.42872721	0.7851646	3.857463	0.5398271	7.240748668	5.355297	1.32541153	0.3296583
X20100920_62_RIN_49	18.537254	0.65715251	0.9268887	5.278517	1.1963665	3.614631140	9.588761	1.38148389	0.4828841

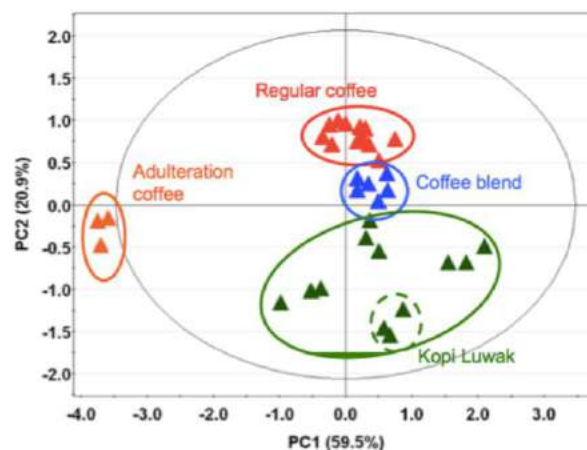
Gambar 5. Contoh data matriks yang diperoleh dari deteksi MS. Disini langkah transposisi terhadap matriks sering dilakukan untuk memudahkan dalam langkah analisa.

Analisa data metabolomik

Setelah melakukan identifikasi dan kuantifikasi maka tahap yang sangat penting adalah melakukan analisa terhadap data yang sangat besar tersebut. Metode analisa yang lazim digunakan antara lain sebagai berikut:

1. Principal Componen Analysis (PCA)

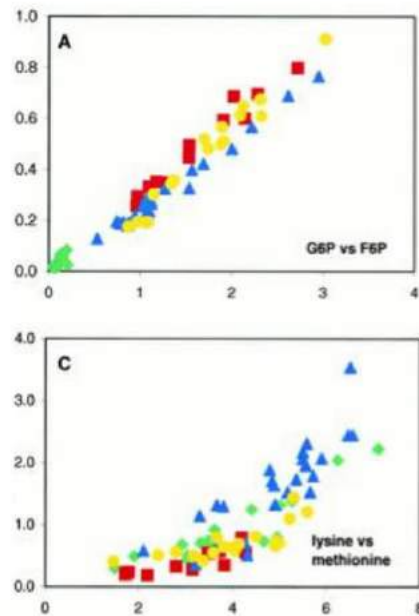
PCA menggunakan semua data metabolit dari sampel untuk menghitung profil metabolik individu yang kemudian dibandingkan dengan semua profil lainnya. Pada intinya, PCA merupakan prosedur statistik yang menggunakan transformasi ortogonal untuk mengkonversi satu set pengamatan dari variabel yang mungkin berkorelasi (entitas yang masing-masing mengambil berbagai nilai numerik) ke dalam satu set nilai variabel tidak berkorelasi linier yang disebut komponen utama. PCA menemukan vektor (komponen utama) yang memberikan pemisahan sampel keseluruhan terbaik. Dalam analisa PCA, data dapat direpresentasikan sebagai plot dua atau tiga dimensi di mana sumbu (komponen utama atau vektor) adalah yang mencakup sebanyak mungkin informasi total yang berasal dari variasi metabolik.



Gambar 6. Ilustrasi profil analisa PCA (Jumhawan dkk, 2013)

2. Korelasi (*Simple Correlation*)

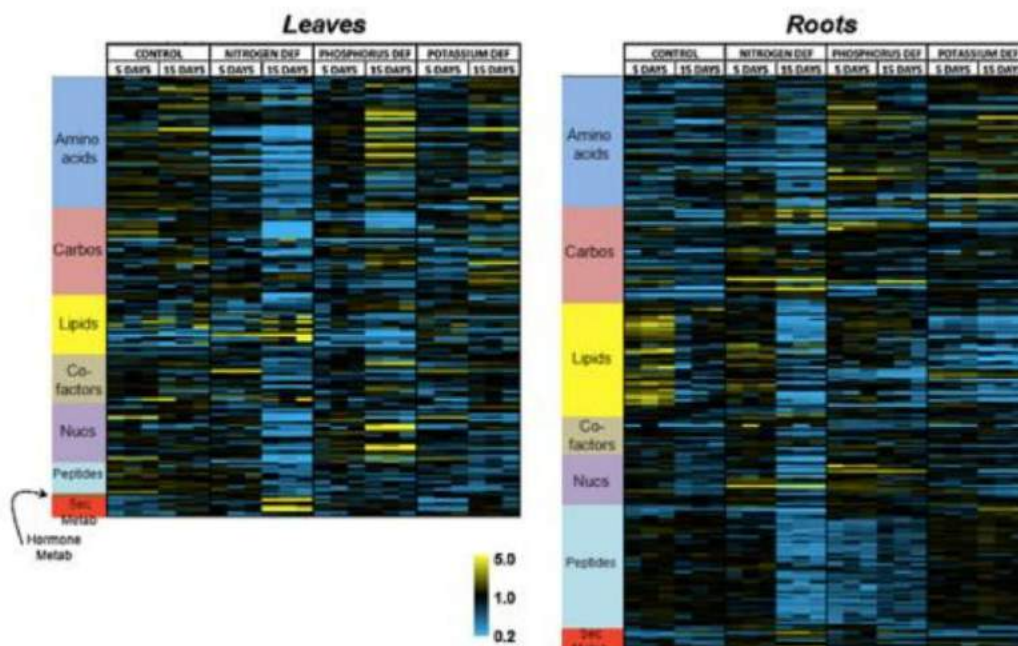
Plot berpasangan yang dihasilkan komputer dari setiap metabolit dalam kumpulan data terhadap setiap metabolit lainnya dapat informatif. Tetapi ketika ratusan metabolit dianalisa, potensi jumlah plot tersebut sangat besar - ribuan - dan kebanyakan dari mereka tidak akan menunjukkan hubungan.



Gambar 7. Ilustrasi profil analisa korelasi

3. Peta panas (*Heat Maps*)

Peta panas adalah representasi grafis dari data di mana nilai-nilai individu yang terkandung dalam matriks direpresentasikan sebagai warna.



Gambar 8. Ilustrasi profil analisa peta panas

Bab 2 Praktikum Analisa Pengaruh Komposisi Metabolit (Pigmen dan Senyawa Volatil) terhadap Aroma pada Tiga Jenis Teh (Hijau, Oolong, Hitam)

Abstrak

Teh merupakan salah satu minuman yang digemari di berbagai negara. Rasa dan aroma yang khas pada teh menentukan kualitas teh tersebut. Kualitas teh yang baik dipengaruhi oleh kandungan metabolomik di dalam teh. Kandungan metabolomik yang paling berperan adalah kandungan pigmen dan senyawa volatil. Sehingga untuk mengkorelasikan metabolomik teh dengan kualitas teh diperlukan suatu penelitian. Penelitian menggunakan sampel dari beberapa negara seperti Indonesia, China dan Srilanka dengan jenis teh hitam, oolong, dan hijau. Instrumen yang digunakan untuk menunjang antara lain adalah KCKT dan GC-MS.

Pendahuluan

Teh dari tanaman *Camellia sinensis* merupakan minuman populer yang bercita rasa khas dengan khasiat yang baik bagi kesehatan. Tanaman ini memiliki diolah menjadi berbagai jenis teh, seperti teh hijau, teh hitam, teh oolong. Teh hijau dihasilkan dari proses pengeringan sedangkan teh oolong proses oksidasinya dihentikan pada 2-3 hari dan yang terakhir teh hitam ditunggu hingga oksidasi penuh. Salah satu manfaat dalam teh adalah dapat mencegah atau mengobati penyakit kronis, termasuk penyakit kardiovaskular dan kanker. Manfaat ini disebabkan adanya metabolit sekunder pada tanaman teh seperti flavonoid, theanine, alkaloid dan lainnya. Namun, senyawa yang terdapat didalamnya juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan proses pengolahannya sendiri.

Cahaya merupakan salah satu faktor lingkungan dimana berperan sebagai sumber utama bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Banyak penelitian telah mengatakan bahwa metabolit sekunder antosianin, katekin, dan flavonol pada berbagai tanaman sebanding dengan radiasi cahaya. Faktor lingkungan lainnya seperti suhu juga mempengaruhi metabolit sekunder dalam teh. Hasil penelitian menunjukkan variasi senyawa secara langsung berkaitan dengan faktor lingkungan dan proses pengolahannya. Lingkungan yang berbeda juga pasti menghasilkan sesuatu yang berbeda. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui hubungan antara zat metabolomik pada teh terhadap analisa sensorinya.

Analisis metabolomik merupakan suatu teknologi yang sangat komprehensif dan telah banyak digunakan dalam penelitian metabolisme tanaman. Analisis metabolomik menggunakan instrumen HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dan GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) dengan jumlah sampel sebanyak 9. Sampel yang digunakan berasal dari berbagai negara dengan variasi jenis teh yang berbeda.

Metode

Sampel

Teh yang digunakan berasal dari berbagai negara yaitu Indonesia, China dan Srilanka. Masing-masing teh diambil tiga jenis yaitu teh hijau, teh hitam, dan teh oolong. Dimana teh yang digunakan mempunyai merk sebagai berikut teh hijau Indonesia (Kepala Djenggot), teh oolong Indonesia (Jawa Oolong 63), teh hitam Indonesia (teh sosro celup), teh hijau China (Xiamen Tea), the oolong China (Xiamen Tea), teh hitam China (Xiamen), teh hijau Srilanka (Dilmah), teh oolong Srilanka (Dilmah), teh hitam Srilanka (Dilmah).

Metode KCKT

Ekstrak teh menggunakan 1 mL aseton. Kemudian dicampur dengan menggunakan vortex selama 1 menit lalu diamkan selama 1 menit. Langkah tersebut dilakukan kembali sebanyak 3 kali. Setelah itu ekstrak di sentrifugasi selama 2 menit dan diambil filtratnya.

Pengekstrakan teh dilakukan sebanyak 2 kali. Hasil filtrat ekstrak teh dikeringkan dengan menggunakan gas nitrogen. Sebelum di injeksikan ke KCKT ekstrak kering di larutkan dengan aseton lalu di filtrasi untuk menghilangkan pengotor yang lain dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L dengan menggunakan metode yang dipublikasikan (Zapata, M., Rodriguez, F. and Garrido, J. L. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase Cs column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195, 29-45).

Analisis HS-SPME

Setiap jenis teh ditimbang sebanyak 4 gram. Kemudian teh dipindahkan ke dalam koff dengan dua leher dimana salah satu lehernya ditutup dengan septum. Teh di dalam koff diseduh dengan 20 mL air mendidih dengan suhu 90 °C dan ditutup leher koff lainnya dengan menggunakan penutup yang dieratkan dengan parafilm. Kemudian koff ditaruh di atas penanas air ada suhu 60 °C dan ditunggu selama 6 menit. Setelah itu koff dipindahkan dan ditunggu hingga suhu teh menurun. Saat teh sudah mencapai suhu ruang, septum ditusuk menggunakan SPME dan ditunggu hingga 1 jam. SPME fiber 65 μ m polidimetilsiloksane/divinilbenzena (PDMS/DVB) diprekondisikan selama 5 menit pada tempat injeksi dari GC pada suhu 220 °C sebelum setiap kali ekstraksi.

Analisis GC-MS

Menggunakan GCMS Shimadzu dengan kolom yang disimpan dengan helium murni sebagai gas pembawa. Kecepatan aliran gas helium adalah 1 ml/min. Setelah ekstraksi, fiber SMPE di desorbed pada injector GC dengan suhu 220°C selama 10 menit. Temperature oven dijaga 50°C selama 5 menit dan kemudian dinaikkan hingga 220°C dengan kecepatan 3°C/min. Temperatur pada sumber ion adalah 200°C dan spectra yang dihasilkan di dalam Electron Impact (EI) mode pada 70 eV. Massa spektrofotometer dioperasikan pada scan penuh, dan tiap puncak diidentifikasi menggunakan perpustakaan 7.0 di GCMS

Analisis Sensori

Analisis sensori teh menggunakan teh sebanyak 5,6 gram dengan air mendidih sebanyak 300 mL. Kemudian diamkan selama 3 menit dengan kondisi gelas tertutup, lalu teh disaring. Analisis aroma dari ampas teh dicium pada gelas yang terdapat ampas teh. Hasil saringan teh dirasakan dengan teknik yang sudah ada. Paramater aroma dan rasa dapat dilihat dari warna teh, baik yang sudah diseduh dan yang belum diseduh. Metode analisis menggunakan panelis ahli sebanyak 5 orang dengan proses analisis diskusi

Tugas Praktikum

Tugas mahasiswa dalam praktikum ini adalah sebagai berikut:

1. Mahasiswa membentuk kelompok 2-3 orang.
2. Mahasiswa membaca modul petunjuk ini dengan teliti dan berdiskusi dengan dosen untuk membuat kerangka kerja.
3. Mahasiswa melakukan presentasi kerangka kerja.
4. Mahasiswa melakukan sampling, ekstraksi, separasi dan identifikasi sesuai dengan petunjuk modul.

5. Mahasiswa mendapatkan data spektra ekstrak teh, kromatogram KCKT dengan resolusi separasi yang baik, kromatogram GC, dan daftar senyawa metabolit yang terdeteksi oleh basis data MS laboratorium MRCPP.
6. Mahasiswa melakukan analisa PCA terhadap senyawa metabolit yang ditemukan dengan analisa GC-MS dan LC-MS.
7. Mahasiswa merancang uji sensori yang terdiri dari rancangan kuesioner, mendapatkan responden dan melakukan uji sensori.
8. Mahasiswa melakukan analisa korelasi antara hasil PCA analisa metabolit dengan uji sensori terkait dengan analisa aroma dari teh.

Bab 3 Praktikum Identifikasi Kandungan Kafein Kopi Arabika (*Coffea Sp.*) Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) serta Pengelompokan Karakteristik dengan Principle Correlation Analysis (PCA)

Abstrak

Kopi (*Coffea Sp.*) memiliki cita rasa serta aroma yang khas akibat proses penyangraian. Penyangraian menyebabkan kandungan gula dan asam amino mengalami reaksi maillard yang mempengaruhi rasa baru dan warna kopi sehingga menjadi lebih kecoklatan. Salah satu kandungan pada kopi yang dominan adalah kafein. Kafein merupakan salah satu jenis senyawa alkaloid xantina yang memberi rasa pahit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar kafein yang ada pada kopi varietas Mandheling, Java dan Toraja menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan korelasi rasa melalui uji organoleptik serta pengelompokan menggunakan PCA. Hasil organoleptik kemudian dilihat korelasinya menggunakan PCA.

Pendahuluan

Pada tahun 2016, Indonesia merupakan produsen kopi terbesar keempat di dunia. Di Indonesia sendiri, kopi (*Coffea Sp.*) merupakan komoditas produksi terbesar keenam setelah minyak kelapa sawit, karet, kelapa, tebu dan coklat. Secara komersial, di Indonesia terdapat dua spesies utama kopi yang dibudidayakan yaitu jenis robusta dan arabika. Setiap jenis kopi memiliki ciri khas rasa yang berbeda-beda, seperti rasa tanah (earthy), asam (acidity) maupun rasa yang lebih lembut saat diminum. Rasa yang dimunculkan juga dipengaruhi oleh lokasi pohon kopi tersebut. Hal ini terjadi karena ketinggian tempat tumbuh dari kopi tersebut akan membuat perbedaan kandungan laktik yang dapat mempengaruhi rasa dari kopi tersebut. Selain laktik juga terdapat kandungan asam laktat yang akan mempengaruhi aroma dari kopi tersebut, dimana aroma kopi menjadi creamy, fruit, earthy dan lain sebagainya.

Kopi juga akan memiliki cita rasa serta aroma khas apabila proses pengolahan (roasting) benar dan sesuai. Pada saat proses roasting, kandungan gula dan asam amino pada kopi akan mengalami reaksi maillard, dengan begitu warna kopi juga akan berubah menjadi lebih kecoklatan dan munculah flavor baru dari kopi.

Salah satu kandungan pada kopi yang dominan adalah kafein. Kafein merupakan salah satu jenis alkaloid yang menyebabkan rasa pahit dan memiliki efek farmakologis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung. Kafein pada kopi memiliki efek stimulasi hingga kecanduan apabila dikonsumsi pada jumlah banyak. Sama halnya dengan rasa dari kopi yang berbeda-beda, kandungan kafein tiap kopi juga berbeda-beda, di mana biasanya kopi arabika mengandung setengah dari total jumlah kafein pada kopi robusta. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar kafein yang ada pada kopi varietas Mandheling, Java dan Toraja menggunakan HPLC dan korelasi rasa melalui uji organoleptik serta pengelompokan menggunakan PCA.

Metode

Sampel

Sampel 9 sampel kopi arabika yang diambil dari 3 daerah/jenis berbeda, yaitu Sumatera Mandheling, Java, dan Toraja dengan masing-masing 3 merk berbeda, yaitu Houdvan Coffee, Siloam Coffee, dan Golden Heritage. Sampel dibeli dari café-café yang berada di kota Malang, Jawa Timur dengan perlakuan bubuk halus dan roasting medium.

Penyiapan Sampel

Sampel kopi yang sudah disiapkan ditimbang 0.077 g. Ekstraksi dilakukan dengan cara penambahan air panas 0.5 mL dan dibiarkan di suhu ruang sebentar. Setelah agak dingin, sampel kopi ditambahkan kembali air sebanyak 0.5 mL. Sampel kopi kemudian dihomogenisasi dengan cara distirrer selama 5 menit. Hasil ekstraksi akan difiltrasi dengan membran filter dan diinjek kedalam HPLC.

Kromatografi Cair

Analisis kromatografi dilakukan oleh RP-HPLC yang dilengkapi dengan detektor array fotodiode (Shimadzu). Sampel diinjeksikan dengan volum 20 μ L. Metode HPLC dengan menggunakan fase gerak pelarut air(asam format 1%) (pelarut A) dan pelarut asetonitril (asam format 1%)(pelarut B). Profil gradien: 0 min, 5% B; 6 min, 10% B; 8 min, 80% B; 10 min, 100% B; 18 min, 5%B. Suhu yang digunakan sebesar 30°C dan flowrate sebesar 1 mL/min digunakan untuk pemisahan di kolom C18 (10 cm x 4.6 mm). Panjang gelombang dideteksi dari 200 sampai 400 nm.

Analisa GC-MS

Sebelum dilakukan identifikasi terhadap senyawa kopi. Kopi perlu dilarutkan terlebih dahulu dengan air panas dan diinkubasi 70°C selama 10 menit. Ekstraksi dilakukan dengan SPME selama 5 menit dan diinjekkan di GCMS selama 15 menit. Suhu dalam GC diatur sebesar 200°C dan mode splitless, dan tekanan 103 kPa. Pemisahan dilakukan dengan kolom RTX WAX. Suhu kolom diatur dengan suhu awal 40°C selama 5 menit, bertambah 3°C/min sampai 180°C, lalu 8°C/min sampai 240°C dan ditahan selama 2 menit. Sampel dideteksi pada 30 sampai 200 AMU. Analisa berdasarkan metode yang telah dipublikasikan (Yang, N., Liu, C., Liu, X., Degn, T. K., Munchow, M., & Fisk, I. (2016). Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. *Food chemistry*, 211, 206-214).

Pengujian Organoleptik

Metode pengujian organoleptik yang digunakan adalah metode deskriptif terhadap 30 panelis. Panelis yang dipilih memiliki rentang umur 20 hingga 30 tahun. Sebelum masuk ke dalam uji organoleptik, diadakan uji keterandalan untuk menyeleksi panelis sehingga didapat panelis yang cukup terlatih. Uji keterandalan dilakukan dengan metode duo-trio test, di mana dari dua sampel yang diujikan panelis diminta untuk memilih sampel mana yang sama dengan kontrol. Hasil uji keterandalan ini mendapatkan 26 panelis yang lolos untuk tahap uji organoleptik.

Setelah uji keterandalan, dilakukan pengenalan sampel kopi arabika dari 3 daerah, yaitu kopi mandheling, toraja dan java. Pengenalan meliputi pengenalan aroma, rasa/flavour, serta aftertaste. Setelah pengenalan sampel dilakukan, dilakukanlah uji organoleptic dengan atribut pada tabel 1.

Tabel 1. Atribut uji organoleptik untuk kopi

Aroma :	- <i>Smooth</i> (tajam)	- Asam
	- <i>Earthy</i> (tanah)	- Manis
Rasa/ <i>Flavour</i> :	- <i>Pahit</i>	- Asam
	- <i>Earthy</i> (tanah)	- Manis
<i>Aftertaste</i> :	- <i>Pahit</i>	- Asam
	- <i>Earthy</i> (tanah)	- Manis

Tugas Praktikum

Tugas mahasiswa dalam praktikum ini adalah sebagai berikut:

1. Mahasiswa membentuk kelompok 2-3 orang.
2. Mahasiswa membaca modul petunjuk ini dengan teliti dan berdiskusi dengan dosen untuk membuat kerangka kerja.
3. Mahasiswa melakukan presentasi kerangka kerja.
4. Mahasiswa melakukan sampling, ekstraksi, separasi dan identifikasi sesuai dengan petunjuk modul.
5. Mahasiswa mendapatkan data spektra ekstrak kopi, kromatogram KCKT dengan resolusi separasi yang baik, kromatogram GC, dan daftar senyawa metabolit yang terdeteksi oleh basis data MS laboratorium MRCPP.
6. Mahasiswa melakukan analisa PCA terhadap senyawa metabolit yang ditemukan dengan analisa GC-MS dan LC-MS.
7. Mahasiswa merancang uji organoleptik yang terdiri dari rancangan kuesioner, mendapatkan responden dan melakukan uji organoleptik berdasarkan ketentuan pada petunjuk di modul.
8. Mahasiswa melakukan analisa korelasi antara hasil PCA analisa metabolit dengan uji sensori terkait dengan analisa organoleptik.

Daftar Pustaka

Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.*, 26(1), 51-78.

Jumhawan, U.; Putri, S. P.; Yusianto, Marwani, E; Bamba, T., Fukusaki, E. (2013) Selection of Discriminant Markers for Authentication of Asian Palm Civet Coffee (Kopi Luwak): A Metabolomics Approach, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 7994–8001.

Fernie, A.R., Trethewey, R.N., Krotzky, A.J., Willmitzer, L. (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to system biology. *Nature Review – Molecular Cell Biology*, 5, 1-7.

Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 30, Unit 30.2.1-24. doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.