

Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Arak Tradisional Bali dan Koktail Menggunakan Skrining Fitokimia, Spektrofotometer UV-Vis dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Spektrometri Massa

Sarawinda Hutagalung*

Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, Jawa Tengah 50711

*email korespondensi: sarawinda.hutagalung@uksw.edu

Received: 10 Februari 2023; **Revised:** 15 Februari 2023; **Accepted:** 19 Maret 2023; **Published:** 26 Maret 2023

ABSTRAK

Arak tradisional Bali merupakan minuman beralkohol yang diperoleh dari hasil fermentasi nira yang berasal dari tanaman siwalan. Arak koktail kecarum adalah minuman beralkohol yang terbuat dari arak dengan penambahan berbagai macam rempah-rempah atau herbal. Pengembangan metode analisis kandungan senyawa kimia pada minuman beralkohol pada umumnya adalah analisis untuk menentukan kandungan alkohol, tetapi penelitian mengenai analisis metabolit sekunder pada minuman beralkohol belum banyak dilakukan secara signifikan. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam arak tradisional Bali dan arak koktail kecarum menggunakan skrining fitokimia, spektrofotometer UV-Vis dan kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS). Sampel arak yang digunakan adalah arak tradisional Bali yang didapatkan dari kabupaten Karang Asem, sedangkan arak koktail kecarum diperoleh dari daerah Sanur, Bali. Analisa metabolit sekunder pada arak tradisional dan arak koktail kecarum dilakukan dengan skrining fitokimia, identifikasi, dan konfirmasi senyawa metabolit sekunder menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan kromatografi cair-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS). Berdasarkan hasil skrining fitokimia, arak tradisional Bali tidak mengandung senyawa metabolit sekunder, sedangkan arak koktail kecarum mengandung senyawa metabolit sekunder golongan senyawa fenolik yang terdiri dari flavonoid, tanin dan kumarin, golongan senyawa terpen yang terdiri dari minyak atsiri, saponin, sterol, dan triterpenoid. Hasil uji kuantitatif menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis diperoleh kadar senyawa fenolik total sebanyak 335,77 mg GAE/mL; kadar senyawa flavonoid total sebanyak 620,17 mg QE/mL; dan kadar senyawa tanin total sebanyak 416,63 mg TAE/mL. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS) diperoleh bahwa arak koktail kecarum mengandung 24 senyawa metabolit sekunder golongan senyawa fenolik yang terdiri dari senyawa flavonoid dan fenol.

Kata-kata kunci: arak tradisional Bali; kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa; metabolit sekunder; skrining fitokimia; spektrofotometer UV-VIS

PENDAHULUAN

Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesis oleh tumbuhan, jamur, bakteri, alga (Roze et al., 2011) dengan berat molekul rendah dengan berbagai jenis aktivitas biologis dan struktur kimia. Metabolit sekunder pada tumbuhan umumnya berperan sebagai mediasi dalam interaksi ekologis tumbuhan dengan herbivora dan antar-spesies lainnya untuk bertahan sehingga meningkatkan kemampuan tumbuhan untuk bertahan hidup (Agostini-Costa et al., 2012). Tumbuhan mampu memproduksi beragam jenis senyawa organik yang dikelompokkan menjadi metabolit primer dan sekunder. Metabolit sekunder tanaman dapat dibagi menjadi empat kelas utama: berdasarkan senyawa biosintesis primernya yaitu alkaloid, senyawa fenolik, terpen, dan glukosinolat (Agostini-Costa et al., 2012; Roze et al., 2011). Metabolit sekunder adalah senyawa organik yang tidak terlibat langsung dalam pertumbuhan normal, perkembangan, atau reproduksi organisme (Fay & Kussmann, 2010).

Spirits atau *liquors* adalah minuman alkohol yang diperoleh dari hasil destilasi minuman fermentasi, dimana proses destilasinya bervariasi sesuai dengan sumber dan produk akhir yang diinginkan. Peralatan yang digunakan untuk penyulingan distilat berupa etanol atau senyawa *flavor* dari bahan baku awal rum,

arak, dan brendi relatif sederhana (Belitz et al., 2009). Beberapa daerah di Indonesia memiliki minuman alkohol yang dibuat secara tradisional seperti arak tradisional Bali, Ballo (Sulawesi Selatan), Swansrai dari Papua (Fitria, 2022). Arak berasal dari bahasa Arab yaitu "arak" (عرق, araq), yang artinya "distilat", sedangkan dalam bahasa Inggris disebut *arrack* yaitu minuman beralkohol hasil dari penyulingan. Arak adalah salah satu jenis minuman beralkohol yang berasal dari Asia Selatan dan Asia Tenggara. Bahan baku arak berasal dari sumber gula yang difermentasi dan didestilasi dari bahan pangan, biji-bijian (beras, beras merah), sayuran atau buah (tebu, nira aren, nira mayang kelapa, kurma, buah ara, dan prem), atau sari tanaman (BPOM Republik Indonesia, 2021; Buglass, 2011). Arak tradisional Bali adalah minuman beralkohol dari hasil penyulingan tuak. Tuak merupakan minuman beralkohol dari hasil fermentasi getah pohon nira (*Cocus nucifera L.*) yang disadap dari bunga siwalan yang masih kuncup dalam tandannya. Nira berasal dari bunga (mayang) berbagai jenis pohon palem seperti lontar (siwalan), kurma, dan kelapa. Nira merupakan suatu cairan yang mengandung berbagai jenis gula tertentu, yaitu sukrosa, glukosa, fruktosa serta karbohidrat, dan memiliki derajat keasaman rata-rata 6-7 dan berbau khas (Nahak et al., 2021). Cairan putih nira mempunyai rasa yang khas yaitu percampuran antara manis, sedikit rasa asam, dan tidak mengandung alkohol (Buglass, 2011). Arak memiliki cita rasa khas, kadar metanol tidak lebih dari 0,01 % (v/v, dihitung terhadap volume produk), dan kadar etanol tidak kurang dari 30% v/v (BPOM Republik Indonesia, 2021).

Perkembangan minuman beralkohol di Bali mengalami perubahan yang signifikan, yaitu dengan bertambahnya industri minuman beralkohol dengan *brand* lokal. Peningkatan industri minuman beralkohol tersebut menyesuaikan dengan karakteristik wisatawan di Bali yang merupakan wisatawan mancanegara. Pelaku usaha industri minuman beralkohol melakukan modifikasi dan inovasi dengan menambahkan arak dengan rempah-rempahan tradisional dan khas Indonesia, seperti cengkeh, jebugarum (pala), dan kayu manis. Penambahan rempah-rempah pada arak bertujuan untuk meningkatkan cita rasa arak tradisional Bali dan melestarikan budaya. Arak tradisional Bali yang telah dimodifikasi dengan penambahan herbal ini disebut dengan arak koktail. Koktail adalah minuman beralkohol dengan berbagai jenis *flavor*, yang terbuat dari hasil destilasi *beverages* dengan kombinasi *flavor* yang terdiri dari satu atau lebih campuran *flavor*. Alkohol dan gula sederhana memberikan energi, tetapi tidak ada nilai nutrisi lainnya (Buglass, 2011). Tanaman rempah-rempah mengandung berbagai jenis senyawa metabolit sekunder, oleh karena itu penambahan rempah-rempah pada pembuatan koktail dapat memberikan kontribusi nutrisi yang signifikan pada arak koktail dan meningkatkan kualitas. Melalui peningkatan cita rasa ini diharapkan arak koktail dapat bersaing dengan jenis *distilled spirits* lainnya seperti Brandy, Gin, Rum, Tequilla, Vodka, dan Whiskey (Prasetya, 2021). Pemerintah Bali melegalisasi arak tradisional Bali sebagai minuman fermentasi yang dijual secara bebas sesuai dengan peraturan gubernur dan peraturan badan pengawas obat dan makanan (BPOM) Republik Indonesia nomor 5 tahun 2021 tentang standar keamanan dan mutu minuman beralkohol minuman beralkohol yang diproduksi di dalam negeri atau diimpor untuk diedarkan di wilayah Indonesia wajib memenuhi standar keamanan dan mutu dan minuman beralkohol harus diproduksi dengan menggunakan bahan baku, proses produksi, dan batas maksimal sesuai dengan ketentuan perundang-undangan (BPOM Republik Indonesia, 2021).

Analisa senyawa metabolit sekunder menunjukkan berbagai sifat fisiokimia dan membutuhkan metode analitik khusus untuk penentuan profil, identifikasi, dan kuantifikasi dalam matriks aslinya (Fay & Kussmann, 2010). Penentuan dan karakterisasi komposisi senyawa kimia yang ada dalam minuman beralkohol menentukan kualitas minuman alkohol tersebut. Sejumlah teknik pemisahan tradisional yang menggunakan variasi pelarut dan reagen memiliki kemampuan untuk memisahkan dan mengidentifikasi metabolit sekunder (Roze et al., 2011). Uji kualitatif kimia metabolit sekunder terhadap arak dilakukan dengan pengujian skrining fitokimia yaitu uji flavanoid, uji fitosterol, uji alkaloid, uji minyak asiri, uji saponin, uji steroid, uji terpenoid dan uji triterpenoid, uji tanin dan uji florotannin, uji liebermann glikosida dan uji keller-kilani, serta uji kumarin (Ciulei, 1994; Kristiani et al., 2015; Ojeh et al., 2013).

Studi metabolit sekunder pada tumbuhan menunjukkan adanya perkembangan dalam hal teknik pemisahan, pendekatan spektroskopi untuk penjelasan struktur, dan metodologi sintesis yang sekarang menjadi dasar kimia organik kontemporer. Metode spektroskopi adalah teknik instrumental yang paling umum digunakan untuk analisis makanan secara kualitatif dan kuantitatif. Spektroskopi melibatkan produksi, penentuan, dan identifikasi spektrum yang dihasilkan melalui interaksi radiasi elektromagnetik dengan sampel makanan yang menghasilkan informasi mengenai struktur dan komposisi molekul. Metode spektroskopi yang digunakan dalam analisis makanan dikategorikan menurut sifat spesies yang dianalisis (spektroskopi atom atau molekuler) atau interaksi radiasi elektromagnetik dengan sampel makanan (penyerapan, emisi, atau difraksi spektroskopi), misalnya spektroskopi UV-Vis dan spektrometri massa atau *mass spectrometry* (MS). Kombinasi dengan teknik pemisahan yang selektif seperti kromatografi cair kinerja

tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS) meningkatkan analisa untuk identifikasi dan konfirmasi senyawa (Nollet & Toldra, 2015).

Pengembangan metode analisis kandungan senyawa kimia pada minuman beralkohol pada umumnya mengenai analisis penentuan kandungan alkohol, tetapi penelitian mengenai analisis metabolit sekunder pada minuman beralkohol belum banyak dilakukan secara signifikan. Berdasarkan hal tersebut, penelitian karakterisasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada arak tradisional Bali dan arak koktail kecarum dari nira kelapa dilakukan dengan analisis fitokimia, analisa kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan analisa kualitatif menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa atau *ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry* (UPLC-QTOF-MS/MS). Berdasarkan uraian di atas, maka tujuan penelitian ini yaitu mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam arak tradisional Bali dan arak koktail kecarum menggunakan skrining fitokimia, spektrofotometer UV-Vis (PG T60), dan kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS).

EKSPERIMEN

Alat dan Bahan

Sampel arak yang digunakan dalam penelitian ini adalah arak tradisional Bali yang didapatkan dari kabupaten Karang Asem dan arak koktail kecarum diperoleh dari daerah Sanur, Bali. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pita magnesium, akuades bebas ion dari Laboratorium Kimia FSM UKSW, *galic acid monohydrate* A.C.S, reagen derajat kemurnian $\pm 98\%$ dari Sigma Aldrich USA, *quercetin dihydrate* derajat kemurnian 97.02% dari HWI *pharma service GmbH* Germany, *tannic acid* derajat kemurnian $\pm 98\%$ dari E-Merck Jerman, asam klorida, etanol, folin-ciocalteu, natrium karbonat, natrium nitrit, aluminium klorida, natrium hidroksida, kalium hidroksida, amonia, kloroform, eter, reagen Dragendorff, reagen Meyer, asam asetat anhidrida, asam asetat glasial, asam sulfat, larutan gelatin, larutan ferri klorida. Semua bahan kimia dan reagen yang digunakan adalah *grade pro-analisis* (derajat PA dari E-Merck Jerman) tanpa pemurnian lebih lanjut. Bahan kimia untuk analisa kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa terdiri dari biotin, chloramphenicol, dan metanol (reagen yang digunakan adalah *grade pro-analisis* dan *grade kromatografi cair* tanpa pemurnian lebih lanjut).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beaker, labu ukur, pipet tetes, tabung reaksi, neraca analitis dengan ketelitian 0,01 g (OHAUS MB 25), *vortex mixer*, kertas saring, *waterbath*, dan kolom C18 acquity UPLC HSS T3 100Å (2.1 x 100 mm, 1.8 µm).

Instrumen

Instrumen yang digunakan adalah *visible lamp* UV 365 nm dan spektrofotometer UV-Vis model PG T60 (Laboratorium Kimia UKSW), kromatografi cair kinerja tinggi (UPLC Acquity I Class System) dan spektrometri massa QTOF-MS/MS tipe Xevo G2S QTOF-Waters (Laboratorium SIG Bogor).

Prosedur Kerja

Skrining Fitokimia Metabolit Sekunder Menggunakan Metode Ciulei (Ciulei, 1994; Kristiani et al., 2015; Ojeh et al., 2013)

Skrining fitokimia metabolit sekunder arak tradisional dan arak koktail kecarum dilakukan dengan metode Ciulei, dimana masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pengulangan.

1. Uji Flavonoid

Ekstrak sampel diuapkan hingga kering kemudian dilarutkan dalam 4-5 tetes HCl pekat. Adanya warna merah atau merah ungu menunjukkan adanya kandungan senyawa flavon, sedangkan adanya warna oranye menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonon.

2. Uji Alkaloid

Seberat 2 gram ekstrak sampel dilembabkan dalam 3-5 mL NH₃ pekat. Pada larutan sampel ditambahkan 20 mL kloroform dan disaring. Filtrat yang diperoleh diteteskan pada kertas saring, kemudian ditetesi lagi dengan reagen Dragendorff sampai terbentuk warna jingga yang menunjukkan uji positif adanya senyawa alkaloid. Sisa filtrat diekstraksi dua kali menggunakan HCl 10%. Sebanyak 5 mL filtrat hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam 2 buah tabung reaksi. Pada tabung reaksi I ditambahkan 2-3 tetes reagen

Meyer, sedangkan pada tabung reaksi II ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendroff. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan kekuningan pada tabung reaksi I dan endapan oranye/jingga pada tabung reaksi II menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

3. Uji Minyak atsiri

Ekstrak sampel diuapkan hingga kering. Jika ada bau khas tumbuhan pada residu, ditambahkan beberapa tetes etanol, kemudian ekstrak sampel diuapkan. Jika terdapat bau khas dari hasil penguapan, hal tersebut menunjukkan adanya minyak atsiri dalam ekstrak.

4. Uji Saponin

Ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan akuades (rasio perbandingan ekstrak sampel:akuades adalah 1:1) dan dikocok selama 5 menit. Adanya gumpalan busa dengan ketinggian minimal 1 cm dan bertahan selama \pm 15 menit mengindikasikan adanya senyawa saponin.

5. Uji Sterol dan Uji Triterpenoid

Ekstrak sampel diuapkan hingga kering, kemudian residu dilarutkan ulang dalam tabung reaksi menggunakan 0,5 mL asetat anhidrat dan 0,5 mL kloroform. Campuran tersebut ditetesi dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat perlahan-lahan melewati dinding tabung reaksi. Terbentuknya cincin violet atau merah kecoklatan di sekitar dinding tabung reaksi menunjukkan uji positif adanya senyawa sterol dan triterpena.

6. Uji Tanin

Ekstrak sampel dilarutkan dalam 10 mL air panas, kemudian ditambahkan 5 tetes NaOH 10% dan disaring. Filtrat dibagi dalam 3 tabung reaksi, dimana tabung reaksi (i) sebagai kontrol; tabung reaksi (ii) ditambahkan 3 tetes larutan gelatin. Jika ditemukan endapan di dasar tabung menunjukkan adanya senyawa tanin. Apabila endapan tidak ada berarti ekstrak mengandung polifenol; pada tabung reaksi (iii) ditambahkan 1-2 tetes larutan FeCl₃. Adanya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa hidrolisatanin sedangkan hijau kecoklatan menunjukkan adanya senyawa katekol (tanin terkondensasi).

7. Uji Fenolik

Ekstrak sampel dilarutkan dalam 2 mL larutan FeCl₃ 2%. Adanya warna biru pada larutan menunjukkan kandungan senyawa fenolik.

8. Uji Kumarin

Ekstrak sampel diuapkan hingga kering, kemudian dilarutkan dalam air panas dan didinginkan. Campuran dibagi ke dalam 2 tabung reaksi, dimana tabung reaksi (i) sebagai kontrol; tabung reaksi (ii) ditambahkan 0,5 mL NH₃ 10%. Pijaran yang kuat di bawah sinar UV mengindikasikan adanya senyawa kumarin dan turunannya.

Skrining Senyawa Metabolit Sekunder dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

1. Preparasi Sampel dengan Pengenceran

Persiapan sampel dalam analisa spektroskopi UV-Vis terdiri dari tahap pengenceran. Sampel yang telah diencerkan kemudian dianalisa menggunakan spektrometri UV-Vis (PG T60). Daerah spektrum elektromagnetik UV-Vis berada dalam kisaran 200–350 nm untuk daerah spektrum elektromagnetik UV dan 350–700 nm untuk daerah spektrum elektromagnetik Vis.

2. Penentuan Kadar Fenolik Total dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Penentuan metoda baku analisis kadar fenolat total secara spektrofotometri sesuai dengan metoda baku acuan. Sejumlah 0,4 mL sampel ditambah dengan 3,6 mL akuades, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Reagen folin-ciocalteu 10% ditambahkan sebanyak 0,4 mL 10% v/v kedalam larutan sampel, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* dan dibiarkan selama 5 menit. Larutan Na₂CO₃ 7% (w/v) ditambahkan sebanyak 4 mL, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* dan larutan sampel digenapkan dengan akuades hingga volumenya 10 mL. Larutan tersebut dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Waktu inkubasi berdasarkan optimum *operating time* yaitu 90 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang (λ) 765 nm. Konversi nilai absorbansi menjadi konsentrasi fenolat total berdasarkan kurva kalibrasi asam galat. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan seri konsentrasi asam galat 10, 20, 30, 40, dan 50 μ g/mL.

3. Penentuan Kadar Flavonoid Total dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Penentuan metoda baku analisis kadar flavonoid total secara spektrofotometri sesuai dengan metoda baku acuan. Sejumlah 1 mL sampel ditambah dengan 4 mL akuades lalu dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Sejumlah 0,3 mL larutan NaNO₃ 0,5% ditambahkan ke dalam larutan sampel dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Larutan sampel tersebut didiamkan selama 5 menit.

Sejumlah 0,3 mL larutan AlCl_3 10% ditambahkan ke dalam larutan sampel kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* dan didiamkan selama 5 menit. Pada larutan sampel ditambahkan 2 mL larutan NaOH 1 M, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Larutan sampel digenapkan hingga menjadi 10 mL dengan akuades, kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Larutan sampel didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian dilakukan pengukuran. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang (λ) 510 nm. Konversi nilai absorbansi menjadi konsentrasi flavonoid total berdasarkan kurva kalibrasi *quercetin*. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan seri konsentrasi *quercetin* 20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g/mL}$.

4. Penentuan Kadar Tanin Total dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Penentuan metoda baku analisis kadar tanin total secara spektrofotometri sesuai dengan metoda baku acuan. Sejumlah 0,1 mL sampel ditambah dengan 7,5 mL akuades lalu dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Sejumlah 0,5 mL reagen folin ciocalteu pekat ditambahkan ke dalam larutan sampel, kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer* dan didiamkan selama 5 menit. Pada larutan sampel ditambahkan larutan Na_2CO_3 35% (w/v) sejumlah 1 mL, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Larutan sampel digenapkan dengan akuades hingga volumenya 10 mL, kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Waktu inkubasi berdasarkan optimum operating time 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang (λ) 725 nm. Konversi nilai absorbansi menjadi konsentrasi tanin total berdasarkan kurva kalibrasi asam galat atau asam tanat. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan seri konsentrasi asam galat atau asam tanat 20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g/mL}$.

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Spektrometri Massa (UPLC-QTOF-MS/MS)

Analisa kromatografi cair kinerja tinggi – spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS) dilakukan di Laboratorium SIG Bogor.

1. Preparasi Standar

Pembuatan larutan Biotin 1 mg/L yaitu dengan cara memipet 25 μL larutan standar biotin 1000 mg/L dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, kemudian dihimpitkan dengan akuabides dan dihomogenkan. Pembuatan larutan Chloramphenicol 1 mg/L yaitu dengan memasukkan 25 μL larutan standar Chloramphenicol 1000 mg/L ke dalam labu ukur 25 mL, kemudian himpitkan dengan akuabides dan dihomogenkan.

2. Preparasi Sampel

Seberat 1 g sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan metanol/pelarut yang sesuai ke dalam sampel dan diultrasonik selama 30 menit. Larutan sampel dihimpitkan dengan metanol/pelarut yang sesuai sampai garis tera dan dihomogenkan.

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Spektrometri Massa (UPLC-QTOF-MS/MS)

Karakterisasi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan metode Qiao et al. (2013)

1. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (UPLC Acquity I Class System)

Pemisahan senyawa metabolit sekunder menggunakan kolom C18 acquity UPLC HSS T3 100 \AA (2.1 x 100 mm, 1.8 μm). Pemisahan senyawa metabolit sekunder menggunakan kromatografi cair-kinerja tinggi acquity UPLC I-Class System, dimana fasa gerak terdiri dari asam format dan asetronitril. Fase gerak A dibuat dengan perbandingan asam format/asetonitril (10:90, v/v), dan fase gerak B terdiri dari asam format/aquabides (10:90, v/v). Suhu pada *autosampler* 15 $^\circ\text{C}$, sedangkan suhu pada kolom kromatografi 40 $^\circ\text{C}$. Ekstrak sampel disaring menggunakan *membrane filter* GHP/PTFE 0.22 μm dan dipindahkan ke vial khusus kromatografi cair kinerja tinggi (UPLC). Sampel diinjeksikan kedalam sistem kromatografi cair kinerja tinggi (UPLC) dengan laju alir 0,6 mL/menit dan volume injeksi sampel adalah 10 μL . Sistem elusi yang digunakan dalam fasa gerak adalah elusi gradien.

2. Pengaturan Spektrometri Massa (QTOF-MS/MS)

Electrospray ionization (ESI) digunakan sebagai sumber ionisasi dalam mengoperasikan mode negatif dan positif. Spektrum massa dalam kisaran m/z 50 hingga 1200 Da.

3. Identifikasi dan Interpretasi *Mass Ion Chromatogram*

Skrining metabolit sekunder meliputi penentuan profil, identifikasi, dan konfirmasi menggunakan *mass analyser* tipe QTOF spektrometri massa dari Waters, yaitu Xevo G2-S QTOF-MS/MS. Senyawa

metabolit sekunder yang telah diidentifikasi dan diinterpretasi oleh spektrometri massa (QTOF-MS/MS) selanjutnya dipilih untuk dikarakterisasi dan diverifikasi struktur senyawa kimianya dengan menggunakan spektrum massa yang terdapat pada data *library UNIFI Scientific Information System* (Qiao et al., 2013) yang sudah terintegrasi dengan instrumen spektrometri massa (QTOF-MS/MS).

HASIL DAN DISKUSI

Analisa metabolit sekunder pada arak tradisional bali dan arak koktail kecarum dilakukan dengan tiga tahap, tahap awal adalah skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui kelompok senyawa metabolit sekunder secara kualitatif. Tahap selanjutnya adalah perhitungan kadar fenolik total, kadar flavonoid total, dan kadar tannin total arak tradisional bali dan arak koktail kecarum dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Identifikasi dan konfirmasi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS). Pada penelitian sebelumnya, analisis kadar alkohol pada minuman beralkohol tradisional (arak) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis telah dilakukan oleh Nahak et al. (2021), analisis fitokimia nira aren dan tuak aren (*Arenga pinnata* (Wurmb) Merr.) telah dilakukan oleh Udayani et al. (2022).

Skrining Fitokimia Metabolit Sekunder Menggunakan Metode Ciulei

Dari hasil preliminer skrining fitokimia metode Ciulei (Ciulei, 1994; Kristiani et al., 2015; Ojeh et al., 2013) menunjukkan arak tradisional bali tidak mengandung senyawa metabolit sekunder, sedangkan arak koktail kecarum mengandung senyawa flavonoid, minyak atsiri, saponin, tri-terpen, sterol, tanin terkondensasi (katekol), fenolik dan kumarin, yang dapat dilihat pada **Tabel 1**. Berdasarkan golongannya maka senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada arak koktail kecarum adalah golongan senyawa fenolik yang terdiri dari flavonoid, tanin dan kumarin, serta golongan senyawa terpen yang terdiri dari minyak atsiri, saponin, sterol dan triterpenoid. Hal tersebut berdasarkan pembagian metabolit sekunder dimana kelompok metabolit sekunder ditentukan berdasarkan biosintesis primernya. Menurut Roze et al. (2011) dan Agostini-Costa et al. (2012) metabolit sekunder dapat diklasifikasikan menjadi 4 golongan besar yaitu terpenoid (minyak atsiri, senyawa glikosid kardiak, karotenoid, dan senyawa sterol), senyawa fenolik (seperti asam fenolik, kumarin, lignan, stilben, flavonoid, tannin, dan lignin), dan senyawa-senyawa yang mengandung nitrogen (alkaloid dan glukosinolat).

Tabel 1. Preliminer skrining fitokimia arak tradisional bali dan arak koktail kecarum

PARAMETER	REAKSI	INDIKATOR	HASIL	
			1	2
Flavonoid	ekstrak kering + 5 tts HCl (pkt)	merah/merah ungu = flavon Orange = flavonon	-	+
Alkaloid	Lar. Sampel + R. Dragendorf	endapan orange	-	-
	Lar. Sampel + R. Mayer	endapan kuning	-	-
Minyak Atsiri	Lar. Sampel dikeringkan	bau menyengat	-	+
	selanjutnya + etanol, dikeringkan	bau menyengat	-	+
Saponin	Lar. Sampel + H ₂ O	Busa ± 30 menit	-	+
Sterol + Triterpenoid	ekstrak kering + 0,5 mL asetat anhidrat + CHCl ₃ + H ₂ SO ₄ lewat dinding tabung	Cincin Violet/merah-coklat	-	+
Tanin	Lar. Sampel + 5tts NaOH 10% = A			
	A + Lar. Gelatin	endapan = tanin	-	+
	A + Lar. FeCl ₃	biru-hitam=hidrolisat tanin hijau-coklat=katekol	-	- +
Fenolik	Lar. Sampel + Lar. FeCl ₃	biru	-	+
Kumarin	Lar. Sampel + Lar. NH ₃	Pijaran kuat dibawah UV	-	+

Keterangan:

- 1.Arak tradisional bali
- 2.Arak koktail kecarum

Skrining Senyawa Metabolit Sekunder dengan menggunakan Spektrofotometer UV-VIS

Berdasarkan hasil analisa spektrofotometer UV-Vis dalam sampel arak tradisional bali tidak ditemukan senyawa metabolit sekunder fenolik, flavonoid dan tanin, sedangkan dalam sampel arak koktail kecarum

ditemukan adanya metabolit sekunder yang terdiri dari senyawa fenolik, flavonoid, dan tannin yang dapat dilihat pada **Tabel 2**, **Tabel 3**, dan **Tabel 4**.

1. Penentuan Kadar Fenolik Total dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS

Berdasarkan **Tabel 2** kandungan senyawa fenolik total dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis diperoleh hasil rerata kandungan senyawa fenolik total sebanyak 335,77 mg GAE/mL. LOD dan LOQ analisis kadar fenolik total secara spektrofotometri UV-Vis PG 60 adalah 1,28 µg GAE/mL dan 4,25 µg GAE/mL. Sub-kelas senyawa fenolik meliputi flavonoid, antosianidin, isoflavan, kalkon, stilben, kumarin dan furanokumarin, monolignol dan lignan, naphtha- dan antrakuinon, dan diarylheptanoid. Senyawa fenolik/polifenol merupakan salah satu senyawa metabolit tanaman sekunder yang memiliki satu atau lebih cincin arena aromatik (fenil) yang terkonjugasi dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Pada umumnya polifenol pada tumbuhan sebagai senyawa glikosida dan sebagian sebagai senyawa ester (Kutchan et al., 2015). Struktur kimia senyawa fenolik sangat kompleks, terdiri dari fenol sederhana, asam fenolik atau flavonoid, hingga senyawa kompleks (polifenol) yang memiliki berat molekul tinggi seperti tanin dan proantosianin (Fay & Kussmann, 2010).

Tabel 2. Perhitungan kadar fenolik total arak tradisional bali dan arak koktail kecarum

KODE	NAMA	[mg GAE/mL] sampel					Rerata
		I	II	III	IV	V	
1	Arak bali	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Arak koktail	308,81	340,27	326,79	367,22	335,77	335,77

GAE = Galic Acid Equivalent

2. Penentuan Kadar Flavonoid Total dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS

Kandungan senyawa flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis diperoleh rerata senyawa flavonoid total sebanyak 620,17 mg QE/mL (**Tabel 3**). LOD dan LOQ analisis kadar fenolat total secara spektrofotometri UV-Vis PG 60 adalah 3,18 µg QE/mL dan 10,61 µg QE/mL. Kelompok senyawa flavanoid seperti flavon (misalnya, apigenin, luteolin, diosmetin), flavonol (misalnya, *quercetin*, *myricetin*, kaempferol), dan senyawa fenol dalam bentuk glikosida (Nollet & Toldra, 2015). Analisis flavonoid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis karena adanya cincin aromatik yang terkonjugasi pada molekulnya sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Harborne, 1999; Nahak et al., 2021).

Tabel 3. Perhitungan kadar flavonoid total arak tradisional bali dan arak koktail kecarum

KODE	NAMA	[mg QE/mL] sampel					Rerata
		I	II	III	IV	V	
1	Arak bali	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Arak koktail	576,47	610,08	643,7	626,89	643,70	620,17

QE = Quercetin Equivalent

3. Penentuan Kadar Tanin Total dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS

Kandungan senyawa tanin total dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis diperoleh rerata senyawa tanin total sebanyak 416,63 mg TAE/mL (**Tabel 4**). LOD dan LOQ analisis kadar tanin total secara spektrofotometri UV-Vis PG 60 adalah 1,03 µg TAE/mL dan 3,45 µg GTAE/mL. Tanin adalah salah satu golongan senyawa polifenol yang juga banyak dijumpai pada tanaman. Tanin dapat didefinisikan sebagai senyawa polifenol dengan berat molekul yang sangat besar yaitu lebih dari 1000 g/mol serta dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein (Udayani et al., 2022). Semua struktur kimia senyawa terpenoid berasal dari pengulangan dan perpaduan lima cabang karbon berdasarkan kerangka isopentane (Kutchan et al., 2015).

Tabel 4. Perhitungan kadar tanin total arak tradisional bali dan arak koktail kecarum

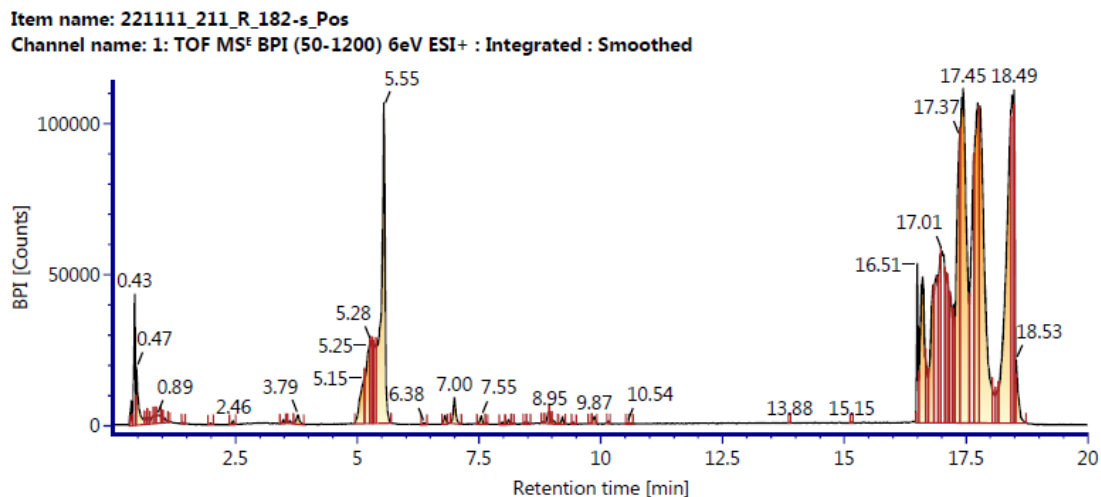
KODE	NAMA	[mg TAE/mL] sampel					Rerata
		I	II	III	IV	V	
1	Arak bali	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Arak koktail	418,48	400,01	436,95	372,29	455,42	416,63

TAE = Total Tannic Acid Equivalent

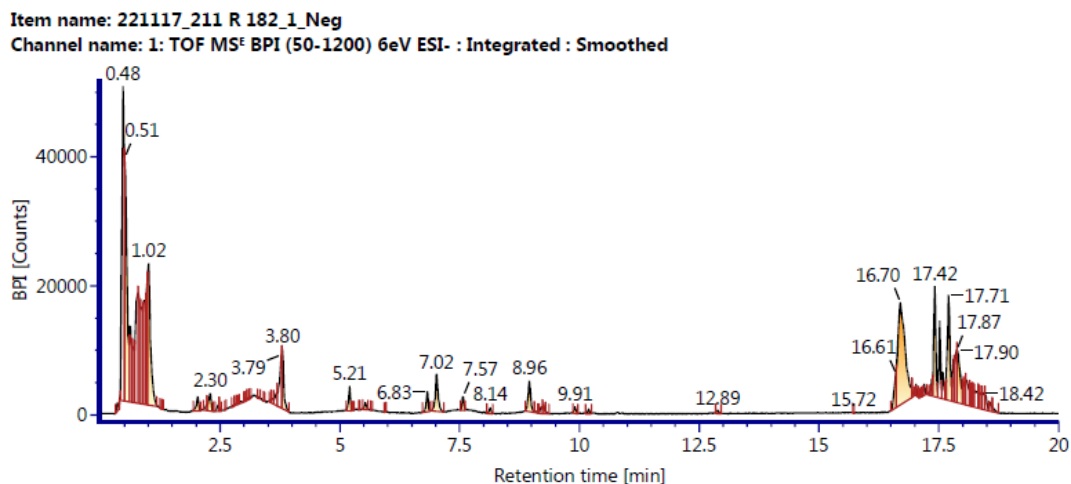
Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Spektrometri Massa (UPLC-QTOF-MS/MS)

1. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (UPLC Acquity I Class System)

Pemisahan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja sangat tinggi menggunakan kolom C18 acquity UPLC HSS T3 100Å (2.1 x 100 mm, 1.8 µm). Kromatografi cair kinerja tinggi (UPLC) digunakan dalam pemisahan senyawa metabolit sekunder arak koktail kecarum karena kromatografi kinerja tinggi merupakan salah satu teknik modern yang banyak digunakan untuk analisa dan pemisahan preparatif senyawa yang terkandung dalam campuran kompleks yang berasal dari senyawa yang berbeda.



Gambar 1. Total ion chromatogram (TIC) metabolit sekunder arak koktail kecarum menggunakan mode ESI (+)



Gambar 2. Total ion chromatogram (TIC) metabolit sekunder arak koktail kecarum menggunakan mode ESI (-)

Pada **Gambar 1** dan **Gambar 2**, berdasarkan *retention time* dari *total ion chromatogram* (TIC) masing-masing senyawa metabolit sekunder dipisahkan berdasarkan kepolarannya dalam fasa diam dan fasa gerak. Pemisahan senyawa berdasarkan kepolarannya dalam campuran kompleks tersebut dipisahkan menurut sifat fisik-kimianya dan juga berdasarkan karakteristik fase gerak dan fase diam (Nollet & Toldra, 2015).

Elusi fasa gerak yang digunakan adalah elusi gradien dimana jumlah pelarut elusi dari fase gerak secara bertahap ditingkatkan selama pemisahan. Elusi gradien dalam kromatografi cair kinerja tinggi (UPLC) mengacu pada teknik mengubah komposisi fase gerak selama proses kromatografi. Metode pemisahan komponen didistribusikan di antara dua fase, fase diam dan fase gerak. Metode kromatografi dengan elusi gradien dilakukan dalam penelitian ini karena pemisahan sampel arak koktail kecarum bertujuan untuk menentukan karakterisasi komponen senyawa fenolik yang terkandung dalam sampel

arak koktail kecarum. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan elusi gradien biasanya digunakan ketika campuran zat terlarut memiliki faktor retensi pemisahan yang luas (Ronards et al., 2004).

2. Pengaturan Spektrometri Massa (QTOF-MS/MS)

Hasil identifikasi kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS) arak koktail kecarum kecarum mengandung senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang terdiri dari flavonoid dan fenol, dimana secara kualifikasi terdiri dari 23 senyawa flavonoid dan 1 senyawa fenol.

Tabel 5. Penentuan senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid menggunakan spektrometri massa (QTOF-MS/MS) mode ionisasi ESI positif (M+H)⁺ dan negatif (M-H)⁻

No.	Mode ESI	Nama Senyawa	Hasil	Metode
Flavonoid				
1	(+)	(-)-Epigallocatechin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
2	(+)	3',4',7-Trihydroxy-flavanone	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
3	(+)	7-Hydroxy-1-methoxy-2-methoxyxanthone	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
4	(+)	Apigenin-6-C-glucosylglucoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
5	(+)	Apigenin-7-O-galactopyranoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
6	(+)	Baicalein-7-O-β-D glucopyranoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
7	(+)	Epicatechin gallate (Epicatechin-3-O-gallate)	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
8	(+)	Epigallocatechin-3-O-gallate	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
9	(+)	Isohyperoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
10	(+)	Leucopelargonidin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
11	(+)	Pedalitin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
12	(-)	(-)-Epigallocatechin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
13	(-)	6-Hydroxykaempferol-3-O-glucoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
14	(-)	Baicalein-7-O-β-D glucopyranoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
15	(-)	Cannabiscitrin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
16	(-)	Cnidimol F	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
17	(-)	Epicatechin gallate (Epicatechin-3-O-gallate)	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
18	(-)	Epigallocatechin-3-O-gallate	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
19	(-)	Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
20	(-)	Maltol	<i>Low Abundance</i>	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
21	(-)	Morin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
22	(-)	Myricetin	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
23	(-)	Patuletin-7-O-[6''-(2-methylbutyryl)]-glucoside	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF

Tabel 6. Penentuan senyawa metabolit sekunder golongan fenol menggunakan spektrometri massa (QTOF-MS/MS) mode ionisasi ESI positif (M+H)⁺ dan negatif (M-H)⁻

No.	Mode ESI	Nama Senyawa	Hasil	Metode
Fenol				
1	(+)	Caesalpins P	Positif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
2	(-)	-	Negatif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF

Tabel 7. Penentuan senyawa metabolit sekunder golongan tanin menggunakan spektrometri massa (QTOF-MS/MS) mode ionisasi ESI positif (M+H)⁺ dan negatif (M-H)⁻

No.	Mode ESI	Nama Senyawa	Hasil	Metode
Tanin				
1	(+)	-	Negatif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF
2	(-)	Ellagic acid	Negatif	18-16-2/MU/SMM-SIG (LCMS/MS) QTOF

Senyawa flavonoid yang diidentifikasi dan dikonfirmasi oleh spektrometri massa (QTOF-MS/MS) adalah (-)-epigallocatechin; 3',4',7-trihydroxy-flavanone; 7-hydroxy-1-methoxy-2-methoxy xanthone;

apigenin-6-C-glucosyl glucoside; apigenin-7-O-galactopyranoside; baicalein-7-O-β-D glucopyranoside; epicatechin gallate (Epicatechin-3-O-gallate); epigallocatechin-3-O-gallate; isohyperoside; leucopelargonidin; pedalitin; 6-Hydroxykaempferol-3-O-glucoside; Baicalein-7-O-β-D glucopyranoside; cannabiscitrin; cnidimol F; kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside; maltol; morin; myricetin; dan patuletin-7-O-[6''-(2-methylbutyryl)]-glucoside (**Tabel 5**). Senyawa fenol yang diidentifikasi adalah caesalpins (**Tabel 6**), sedangkan senyawa golongan tanin tidak teridentifikasi (**Tabel 7**). Senyawa fenolik tersebut diidentifikasi, dikonfirmasi, dan diverifikasi menggunakan *mass fragment UNIFI Natural Product Library*. Metode ionisasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode ionisasi *electronspray ionization* (ESI) dengan *mode* fragmentasi positif dan fragmentasi negatif. Ionisasi *elektrospray* (ESI) adalah metode *soft ionization* karena analit spesies yang terionisasi (kation atau anion) hanya dalam jumlah yang sangat kecil saat proses ionisasi. Metode ini berlaku untuk molekul polar ukuran kecil, dimana hampir tidak ada fragmentasi yang teramati dan juga molekul ukuran makromolekul (misalnya protein atau polisakarida). Jika dilihat dari fragmentasi ion yang dihasilkan, spesies jenis apapun baik berupa molekul organik atau unsur anorganik yang dianalisis dalam spektrometer massa harus diionisasi terlebih dahulu kecuali jika sudah ada dalam bentuk ion. Ionisasi analit (M) terjadi dengan menghilangkan atau menambahkan elektron untuk menghasilkan M^+ atau M^- . Proses ionisasi molekul dalam spektrometri massa terjadi pada *ionization source*, yang juga memiliki peranan penting dalam mentransfer ion yang baru diproduksi ke dalam fase gas sebelum dimasukkan ke dalam bagian *mass analyzer* spektrometer massa. Dalam kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa, flavonoid dapat dideteksi dengan fragmen positif (PI) maupun dengan fragmen negatif (NI) dengan menggunakan *ionization source atmosfer pressure chemical ionization* (APCI) atau *elektrospray ionization* (ESI). Ion $[M+H]^+$ dan $[M-H]^-$ mewakili ion *mass to ratio* (m/z) yang paling mudah untuk difragmentasi. Polifenol memiliki sifat asam, oleh karena itu ionisasi ionnya cenderung terjadi sebagai fragmentasi ion negatif yang menghasilkan sensitivitas tertinggi dan fragmentasi yang terbatas. Fragmentasi ion memberikan informasi struktur kimia yang penting untuk senyawa flavonoid dan digunakan untuk menentukan distribusi substituen antara cincin A dan B pada senyawa flavonoid (Fay & Kussmann, 2010).

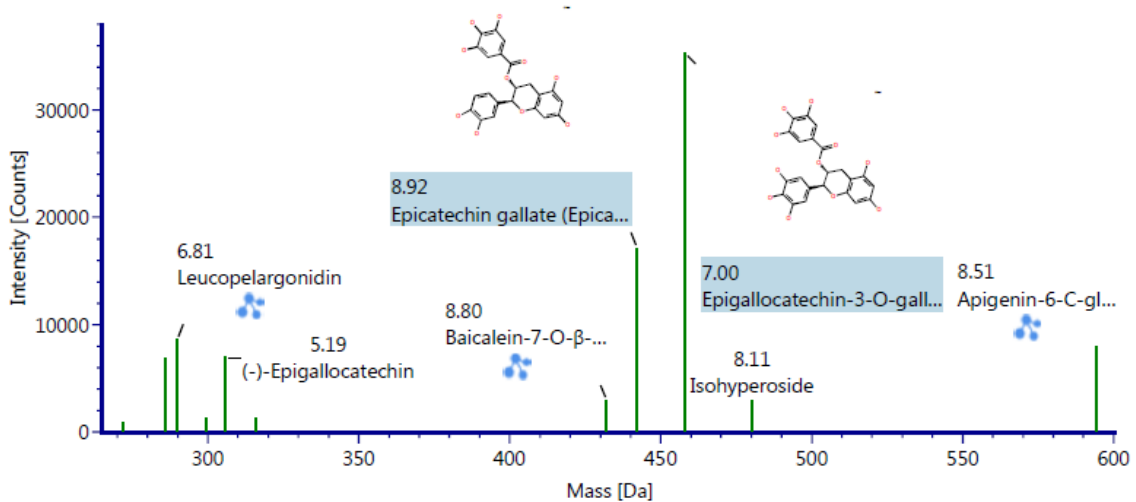
3. Identifikasi dan Interpretasi *Mass Ion Chromatogram*

Identifikasi dan karakterisasi senyawa dilakukan dengan perbandingan waktu retensi (RT), *fragmentasi mass error* ≤ 5 ppm, *isotope match* MZ RMS PPM ≤ 6 ppm dan *isotope match* MZ RMS % ≤ 10 %, *intensity/response* ≥ 300 , *fragment match* ≥ 1 *mass fragment*, dianggap *low abundance* jika *Intensity/Response* < 300 .

Berdasarkan *full scan mass ion chromatogram* spektrometri massa (QTOF-MS/MS) mode ESI positif (+) dan ESI negative (-) pada **Gambar 3 dan Gambar 4** menunjukkan senyawa metabolit sekunder yang paling melimpah dalam arak koktail kecarum adalah epicatechin gallate (epicatechin-3-O-gallate) yang diikuti oleh epigallocatechin-3-O-gallate dan cnidimol F, sedangkan senyawa metabolit sekunder dengan jumlah yang sedikit (*low abundance*) diidentifikasi sebagai senyawa morin dan maltol. Maltol ditemukan dengan jumlah yang paling sedikit, hal ini dapat dilihat dari *intensity* kromatogram yang rendah pada **Gambar 4**. Pengukuran massa yang akurat dari QTOF-MS/MS merupakan faktor yang menentukan identifikasi dan konfirmasi senyawa fenolik dalam arak koktail kecarum. Hal ini dikarenakan arak koktail kecarum dianalisis menggunakan 2 *mass analyzer* yaitu *quadropole analyser* dengan akurasi 100 mg/L dan *time of flight* (TOF) *analyser* dengan akurasi pengukuran 10 mg/L.

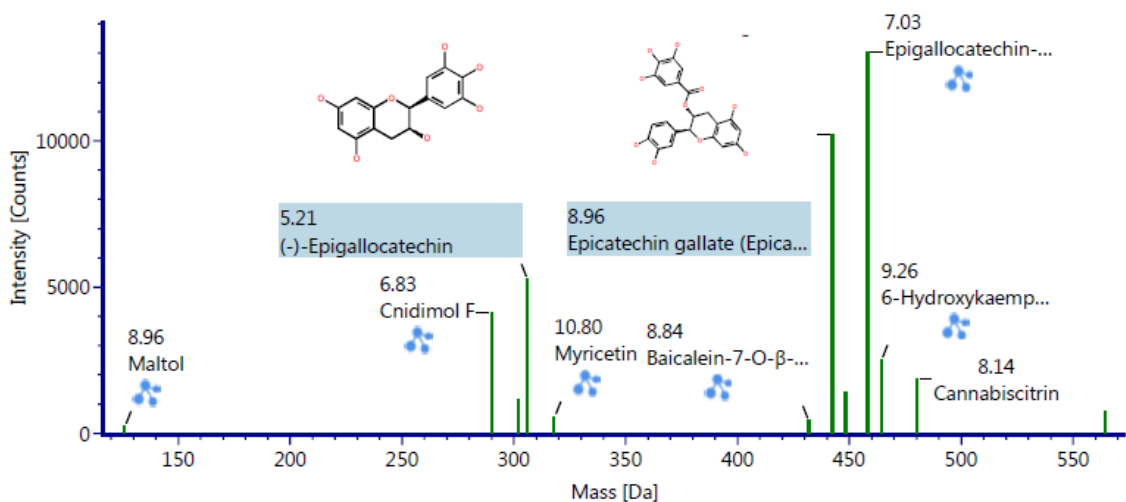
Kombinasi *mass analyzer* dalam instrument spektrometer massa, Q-Orbitraps (*mass limit* 4000 Th) dan Q-TOF (*mass limit* 10.000 Th) berperan serta dalam proses fragmentasi ion secara spesifik serta mempercepat identifikasi dan konfirmasi data (*mass library*), bahkan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa yang tidak diketahui dalam campuran (*analysis untarget compound*). Dengan adanya kombinasi dua *mass analyzer*, fragmentasi *mass ion* diidentifikasi sebagai *precursor ion* (*parent ion*), dan konfirmasi *mass ion* sebagai *product ion* (*daughter ion*). Keunggulan Q-TOF dan Q-Orbitraps adalah memiliki kapasitas secara tentatif atau secara utuh untuk mengidentifikasi senyawa yang tidak diketahui berdasarkan penyerapan UV, spektrum spektrometri massa dan informasi dalam literatur, tanpa penggunaan standar sebagai referensi dalam hal konfirmasi identitas. UPLC-QTOF-MS/MS ditetapkan sebagai sistem deteksi yang penting dalam karakterisasi senyawa fenolik, karena keakuratan massa dan distribusi spektrum isotop dengan menggunakan sistem spektrometri massa MS ataupun MS/MS (Tzima et al., 2018).

Item name: 221111_211_R_182-s_Pos



Gambar 3. Full scan mass ion spectra senyawa metabolit sekunder dengan mode ionisasi ESI positif (M+H)⁺

Item name: 221117_211 R 182_1_Neg



Gambar 4. Full scan mass ion spectra senyawa metabolit sekunder dengan mode ionisasi negatif (M-H)⁻

Pada penelitian sebelumnya, analisa arak pada umumnya menentukan kandungan alkohol dengan menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa dan belum ada data yang dilaporkan dalam literatur untuk penentuan profil senyawa metabolit sekunder arak koktail kecarum. Oleh karena itu, jika dibandingkan dengan literatur, data yang disajikan dalam penelitian ini adalah laporan pertama yang menunjukkan karakterisasi arak koktail kecarum bali jenis kecarum. Dalam konteks ini, dapat dikatakan bahwa arak koktail kecarum selain mengandung alkohol juga mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat dianggap menambah nilai nutrisi dan kualitas minuman arak koktail kecarum sebagai minuman beralkohol. Secara keseluruhan, metode analisa metabolit sekunder arak tradisional bali dan arak koktail kecarum dimodifikasi secara kualitatif dan kuantitatif, dimana *preliminary* skrining senyawa penyusunnya menggunakan skrining fitokimia, kuantifikasi senyawa fenolik, flavonoid dan tanin menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan identifikasi senyawa flavonoid dan fenol menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil skrining fitokimia, senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada arak koktail kecarum adalah senyawa fenolik yang terdiri dari flavonoid, tanin dan kumarin, serta golongan senyawa terpen yang terdiri dari minyak atsiri, saponin, sterol, dan triterpenoid. Berdasarkan hasil uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-VIS PG T60 kandungan fenolik total adalah 335,77 mg GAE/mL; kadar senyawa flavonoid total adalah 620,17 mg QE/mL; dan kadar senyawa tanin total adalah 416,63 mg TAE/mL, dimana senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan pada arak koktail kecarum adalah senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa (UPLC-QTOF-MS/MS) diperoleh bahwa arak koktail

kecarum mengandung 24 senyawa metabolit sekunder golongan senyawa fenolik yang terdiri dari flavonoid dan fenol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada kepada Universitas Kristen Satya Wacana atas dukungan hibah penelitian perseorangan/kelompok wajib UKSW Tahun Anggaran 2022 dengan No. SK 331/Pen./Rek./9/2022 sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Kimia Fakultas Sains dan Matematika Universitas Kristen Satya Wacana atas dukungan dalam penggunaan fasilitas penelitian yang mendukung suksesnya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agostini-Costa, T. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. (2012). *Chromatography and Its Applications - Secondary Metabolites (Chapter 8)* (S. Dhanarasu (ed.); 1st ed.). InTech. www.intechopen.com
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. In *Springer* (4th ed.). Springer-Verlag Berlin.
- B POM Republik Indonesia, Pub. L. No. 5, 1 (2021). [https://jdih.pom.go.id/product/search/7cd137548a656adf7367adb671fbf813/5/2021/TENTANG Standar Keamanan dan Mutu Minuman Beralkohol/5/product](https://jdih.pom.go.id/product/search/7cd137548a656adf7367adb671fbf813/5/2021/TENTANG%20Standar%20Keamanan%20dan%20Mutu%20Minuman%20Beralkohol/5/product)
- Buglass, A. (2011). *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. In *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects* (1st ed., Vols. 1–2). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470976524>
- Ciulei, I. (1994). *Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. Practical Manual on the Industrial Utilisation of Medicinal and Aromatic Plants*. UNIDO-Romania Centre.
- Fay, L. B., & Kussmann, M. (2010). *Mass Spectrometry and Nutrition Research*. In P. Belton (Ed.), *RSC Food Analysis Monographs* (Issue 9). RSC Publishing. www.rsc.org
- Fitria, R. (2022). *Ini 7 Minuman Alkohol khas Indonesia, Tuak hingga Arak Bali*. <https://food.detik.com/info-kuliner/d-5939648/ini-7-minuman-alkohol-khas-indonesia-tuak-hingga-arak-bali>
- Harborne, J. (1999). *The Flavonoids Advances in Research* (1st ed.). CRC Press.
- Kristiani, E. B. E., Kasmiyati, S., & Herawati, M. (2015). *Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antibakteri In Vitro Ekstrak Heksana-Petroleum Eter Artemisia cina Berg. ex Poljakov*. *Agric Jurnal Ilmu Pertanian*, 27(1 & 2), 30–37. <https://doi.org/10.24246/agric.2015.v27.i1.p30-37>
- Kutchan, T. M., Gershenzon, J., Moller, B. L., & Gang, D. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants - Natural Product (Chapter 24)* (W. G. Bob B. Buchanan & and Russell L. Jones (eds.); 2nd ed.). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_33.
- Nahak, B. R. H., Aliah, A. I., & Karim, S. (2021). *Analisis Kadar Alkohol pada Minuman Beralkohol Tradisional (Arak) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(4), 448–454. <https://jsk.farmasi.unmul.ac.id/index.php/jsk/article/view/360>
- Nollet, L. M. L., & Toldra, F. (2015). *Handbook of Food Analysis* (3rd ed.). CRC Press. <http://www.crcpress.com>
- Ojeh, E. A., Adegor, C. E., Ovuakporaye, I. S., & L, E. O. (2013). *Preliminary Phytochemical Screening and Antidiarrheal Properties of Manniophyton fulvum*. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 10(2), 46–52. <https://doi.org/10.9790/0853-01024652>
- Prasetya, A. D. (2021, September 19). *Mengenal Arak Bali dan Cara Menikmatinya*. <https://merahputih.com/post/read/mengenal-arak-bali-dan-cara-menikmatinya>

- Qiao, L., Lewis, R., Hooper, A., Morphet, J., Tan, X., & Yu, K. (2013). Using Natural Products Application Solution with UNIFI for the Identification of Chemical Ingredients of Green Tea Extract. *Waters Application Note*, 1–6. <https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2013/720004837/720004837-en.pdf>
- Ronards, K., Haddad, P. R., & Jackson, P. (2004). Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods : Chapter 5 - High performance liquid chromatography: Instrumentation and techniques. In *Elsevier Academic Press* (Vol. 13, Issue 1). Elsevier Inc.
- Roze, L. V., Chanda, A., & Linz, J. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.006>
- Tzima, K., Brunton, N. P., & Rai, D. (2018). Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in lamiaceae plants—a review. *Plants*, 7(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/plants7020025>
- Udayani, N. N. W., Ratnasari, N. L. A. M., & Nida, I. D. A. A. (2022). Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Alkaloid, Flavonoid dan Tanin) pada Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma Caesia* Roxb.). *Jurnal Pendidikan Tambusai*, 6(1), 2088–2093. <https://www.jptam.org/index.php/jptam/article/view/3256>