



PENGEMBANGAN METODE LC-MS/MS UNTUK PROFIL METABOLIT SUSU SAPI

GEITA YULYAN FIREL



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Pengembangan metode LC-MS/MS untuk Profil Metabolit Susu Sapi” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, 12 September 2025

Geita Yulyan Firel
G4501222045

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

GEITA YULYAN FIREL. Pengembangan Metode LC-MS/MS untuk Profil Metabolit Susu Sapi. Dibimbing oleh ETI ROHAETI, WIDANINGRUM, dan MOHAMAD RAFI

Susu sapi mengandung berbagai metabolit penting, termasuk asam amino, karbohidrat, asam lemak, dan vitamin. Profil metabolit menggunakan *liquid chromatography–tandem mass spectrometry/mass spectrometry* (LC-MS/MS) (LC-MS/MS) memungkinkan deteksi metabolit yang komprehensif; namun, keberhasilan pemisahan sangat bergantung pada kondisi instrumen yang optimum. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode profil metabolit untuk komponen susu sapi menggunakan LC-MS/MS. Pengoptimuman dilakukan terhadap parameter LC-MS/MS (fase gerak, elusi gradien, dan rentang pemindaian) dalam enam variasi, serta teknik pemisahan (jenis pelarut, waktu ekstraksi, dan kecepatan sentrifugasi) dalam dua belas variasi. Evaluasi didasarkan pada jumlah total metabolit yang terdeteksi dan teridentifikasi, kualitas kromatogram, dan nilai *hierarchical chromatographic response function* (HCRF). Kinerja analitik metode optimum dievaluasi sesuai dengan pedoman *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) yang berfokus pada parameter presisi untuk memastikan keandalan metode. Metode optimum diterapkan untuk membedakan profil metabolit tiga jenis susu sapi (segar, UHT, dan pasteurisasi) menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA).

Hasil pengoptimuman menunjukkan bahwa variasi LC_2 (asetonitril–air, 25 menit, 100–1500 m/z) dan TP_10 (3% asam format dalam asetonitril, sentrifugasi pada 3420×g selama 30 menit) dipilih sebagai kondisi optimum, karena memungkinkan deteksi dan identifikasi metabolit yang komprehensif, menghasilkan bentuk puncak kromatografi yang optimum, dan mencapai nilai HCRF tertinggi. Sebanyak 56 metabolit berhasil diidentifikasi, termasuk metabolit primer dalam susu sapi, seperti asam amino, karbohidrat, asam lemak, dan vitamin. Evaluasi kinerja analitik menggunakan sampel susu segar dan UHT menunjukkan nilai %RSD <2% untuk waktu retensi relatif (RRT) dan <20% untuk luas puncak relatif (RPA), yang menunjukkan bahwa metode ini sensitif, presisi, dan andal untuk analisis metabolit susu sapi. Berdasarkan hasil analisis komponen utama (PCA), kondisi optimum dari kombinasi LC_2 dan TP_10 menghasilkan data metabolit yang akurat dan secara signifikan membedakan ketiga jenis susu sapi.

Kata kunci: Analisis PCA, metabolomik menggunakan LC-MS/MS, pengoptimuman kondisi metode, susu sapi, validasi metode.



SUMMARY

GEITA YULYAN FIREL. LC-MS/MS Methods Development for Metabolite Profiling of Cow Milk. Supervised by ETI ROHAETI, WIDANINGRUM, and MOHAMAD RAFL.

Cow's milk contains various essential metabolites, including amino acids, carbohydrates, fatty acids, and vitamins. Metabolomics profiling using liquid chromatography–tandem mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS), enables comprehensive metabolite detection; however, successful separation strongly depends on optimized instrument conditions. This study aimed to develop a metabolite profiling method for cow's milk components using LC-MS/MS.

Optimization was performed on LC-MS/MS parameters (mobile phase, gradient elution, and scan range) in six variations, as well as separation techniques (solvent type, extraction time, and centrifugation speed) in twelve variations. Evaluation was based on the total number of detected and identified metabolites, chromatogram quality, and hierarchical chromatographic response function (HCRF) values. Analytical performance of the optimum method was evaluated according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) guidelines, focusing on precision parameters to ensure method reliability. The optimum method was applied to distinguish the metabolite profiles of cow's milk with three different types of cow's milk (fresh, UHT, and pasteurized) using Principal Component Analysis (PCA).

The optimization results showed that the variation LC_2 (acetonitrile–water, 25 min, 100–1500 m/z) and TP_10 (3% formic acid in acetonitrile, centrifugation at $3420 \times g$ for 30 min) were selected as optimal conditions, as they enable comprehensive metabolite detection and identification, produce optimal chromatographic peak shapes, and achieve the highest HCRF values. A total of 56 metabolites were successfully identified, including primary metabolites in cow's milk, such as amino acids, carbohydrates, fatty acids, and vitamins. Evaluation of analytical performance using fresh and UHT milk samples showed %RSD values of <2% for relative retention time (RRT) and <20% for relative peak area (RPA), demonstrating that the method is sensitive, precise, and reliable for cow's milk metabolite analysis. Based on principal component analysis (PCA) results, the optimal conditions from the combination of LC_2 and TP_10 provided accurate metabolite data and significantly distinguished the three types of cow's milk.

Keywords: Condition optimization method; cow's milk; metabolomics using LC-MS/MS; PCA analysis; validation method



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2025
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PENGEMBANGAN METODE LC-MS/MS UNTUK PROFIL METABOLIT SUSU SAPI

GEITA YULYAN FIREL

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Kimia

**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Judul Tesis : Pengembangan metode LC-MS/MS untuk profil metabolit susu sapi
Nama : Geita Yulyan Firel
NIM : G4501222045

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Dra. Eti Rohaeti, MS.

Pembimbing 2:
Widaningrum, STP, M.Si, Ph.D

Pembimbing 3:
Prof. Dr. Mohamad Rafi, M.Si

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Irmanida Batubara, S.Si, M.Si
NIP 19750807 200501 2 001

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam:
Dr. Berry Juliandi, S.Si, M.Si
NIP 19780723 200701 1 001



Tanggal Ujian:
9 September 2025

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Desember 2023 sampai bulan Agustus 2025 ini ialah metabolomik, dengan judul “Pengembangan metode LC-MS/MS untuk profil metabolit susu sapi”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Dra. Eti Rohaeti, MS., Widaningrum, STP, M.Si, Ph.D., dan Prof. Dr. Mohamad Rafi, M.Si. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada penguji ujian tesis, Dr. Wulan Tri Wahyuni, S.Si, M.Si., dan moderator dalam ujian tesis, Dr. Dra. Charlena, M.Si.

Terima kasih kepada Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk berkolaborasi dalam riset metabolomik susu, kepada Alfi Hudatul Karomah, M.Si. selaku staf Laboratorium Metabolomik di *Advanced Laboratory* yang telah membantu teknik kerja laboratorium dan pengumpulan data selama penulis melaksanakan penelitian. Di samping itu, penghargaan penulis dedikasikan kepada Bapak Firdaus dan Ibu Rukmaneli selaku orang tua penulis yang telah membiayai, memberikan dukungan setiap saat, mendoakan, dan mencurahkan kasih sayang.

Ucapan terima kasih juga tidak lupa penulis sampaikan atas dukungan dari Elan Hernadi, M.Si., Riva Silvia, M.Si., dan Retti Hanggia Angela, M.Si. yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama masa studi metabolomik. Terakhir, penulis mengucapkan terima kasih kepada Ummahatul Mujahidah, M.Si., Rani Melati Sukma, M.Si., Vivi Septya, M.Si., Puput Melati, M.Si., Laela Wulansari, M.Si., Shafira, M.Si., Riska Nurjannah, Mela Agitasari, Randy Trafino, Deva Indriyani, Qory Sidwa Jufri, Juniyas Aditya, teman-teman COMDEV, dan uda uni IMMPACS yang telah menemani penulis, memberikan semangat, saran dan masukkan dalam menyelesaikan tesis ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, September 2025

Geita Yulyan Firel

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Susu Sapi	3
2.2 Metabolomik	3
2.3 LC-MS/MS	4
2.4 Ekstraksi	5
2.5 Sentrifugasi	7
2.6 <i>Hierarchical Chromatography Response Function (HCRF)</i>	7
2.7 Analisis Kemometrik: PCA	8
2.8 Validasi Metode Analisis	8
III METODE	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Prosedur Kerja	11
3.4 Analisis Data	13
3.5 Validasi Metode Analisis	15
3.6 Aplikasi Metode untuk Mendiskriminasi Tiga Jenis Susu Sapi Berbeda Menggunakan PCA	15
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Kondisi LC-MS/MS Optimum	16
4.2 Jenis Pelarut, Kecepatan, dan Waktu Sentrifugasi Optimum	21
4.3 Evaluasi Kinerja Analisis	28
4.4 Diskriminasi Susu Sapi Segar, UHT, dan Pasteurisasi Menggunakan PCA	29
V SIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Simpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37
RIWAYAT HIDUP	49

DAFTAR TABEL

1	Komposisi susu sapi	3
2	Metabolit susu sapi yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya	3
3	Studi LC-MS/MS dalam menganalisis metabolit susu sapi	5
4	Variasi kondisi LC-MS/MS	12
5	Variasi kondisi jenis pelarut, kecepatan, dan waktu sentrifugasi	13
6	Total metabolit terdeteksi dan teridentifikasi pada enam variasi LC MS/MS	16
7	Metabolit susu sapi teridentifikasi pada kondisi LC-MS/MS optimum	18
8	Nilai HCRF dari enam variasi kondisi LC-MS/MS	21
9	Total metabolit terdeteksi dan teridentifikasi pada 12 variasi pengoptimuman jenis pelarut, kecepatan, dan waktu sentrifugasi	22
10	Metabolit susu sapi teridentifikasi pada kondisi LC-MS/MS, pelarut, kecepatan, dan waktu sentrifugasi optimum	23
11	Nilai HCRF dari 12 variasi kondisi jenis pelarut, kecepatan, dan waktu sentrifugasi	27
12	Presisi <i>intra-day</i> dan <i>inter-day</i> pada sampel susu sapi segar dan UHT	28

DAFTAR GAMBAR

1	Kromatogram variasi LC 2 menggunakan (a) ESI(+) (b) ESI(-)	20
2	Kromatogram variasi TP 10 menggunakan (a) ESI(+) (b) ESI(-)	26
3	Kromatogram luas puncak dari susu sapi segar, UHT, dan pasteurisasi	29
4	Plot skor PCA tiga jenis susu sapi (segar, UHT, pasteurisasi)	30

DAFTAR LAMPIRAN

1	Diagram alir penelitian	37
2	Perbandingan kromatogram enam variasi LC-MS/MS	38
3	Perbandingan kromatogram 12 variasi jenis pelarut, kecepatan, dan waktu sentrifugasi	41
4	Contoh perhitungan nilai HCRF kondisi LC-MS/MS optimum	47
5	Contoh perhitungan nilai HCRF kondisi pemisahan optimum	47
6	Kromatogram susu segar dan UHT dalam evaluasi kinerja analisis	48