

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama 5 bulan, yaitu pada bulan Maret sampai dengan bulan Juli 2023 dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan perkecambahan hingga ekstraksi sampel.
- 2) Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI untuk melakukan uji sampel dengan alat UHPLC-ESI-Triple Quadrupole-MS/MS (*Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electropray Ionization-Triple Quadrupole-Tandem Mass Spectrometry*).

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

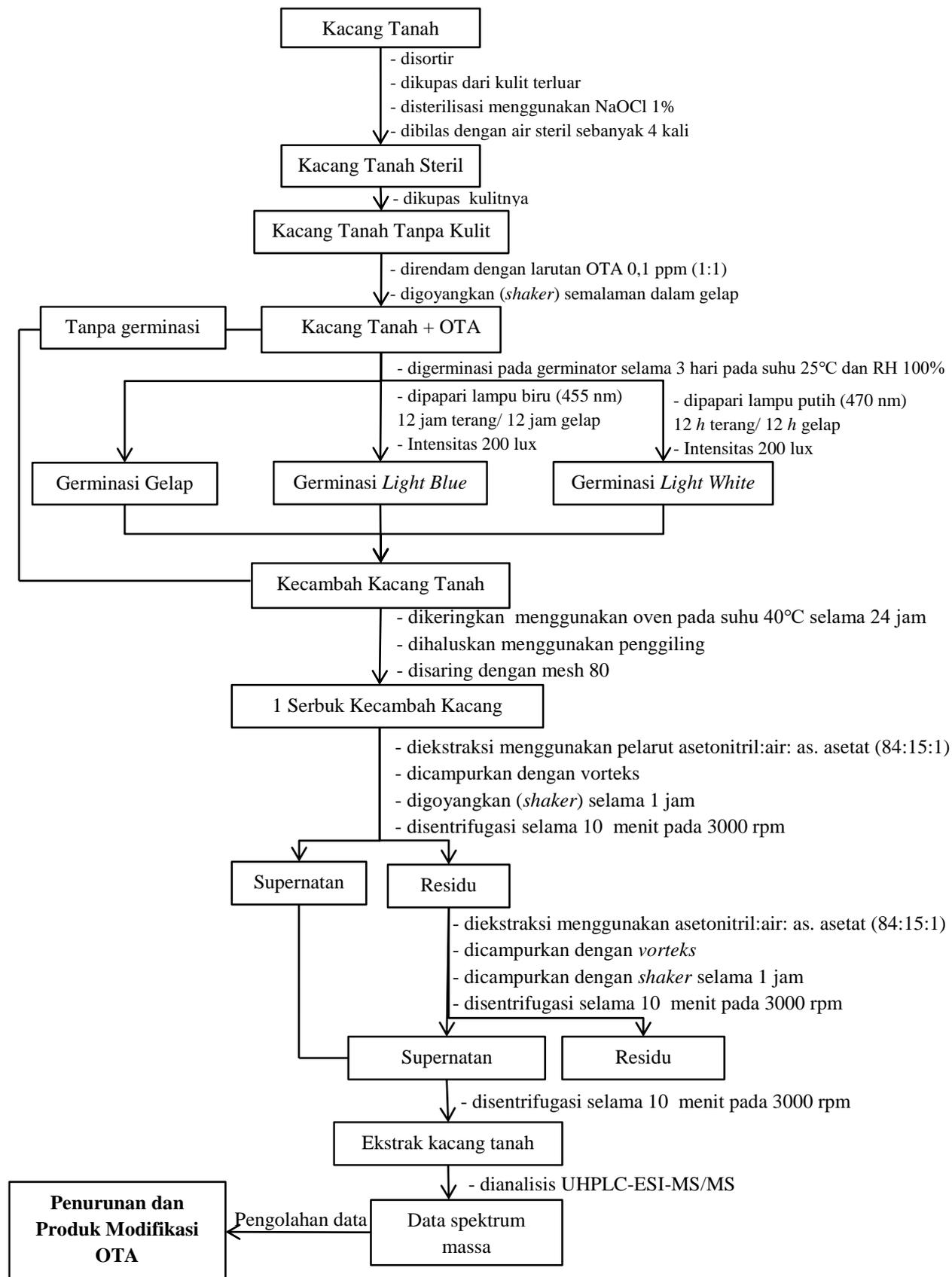
Penelitian ini menggunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas (gelas kimia 100 mL, 400 mL, gelas ukur 10 dan 100 mL, pipet tetes, labu ukur 50, 100, dan 250 mL, corong kaca, batang pengaduk), mikropipet 1000-5000 μL (DragonLab), mikropipet 1-200 μL (Mettler Toledo), mikropipet 1-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL , 1000-5000 μL (Dragon Lab), tip 10 μL , 200 μL , 300 μL , 5000 μL (MF Lab), spatula, tabung falcon 15 mL dan 50 mL (Onemed), tabung eppendorf 1,5 mL (Onemed), neraca analitik (Metler Toledo tipe ME204), alat perkecambahan (*germinator*) yang dilengkapi dengan *heating mat* 12V (Hyindoor), *humidifier* DC 24V, *mini fan* DC 12V (Happy), toples plastik, sensor suhu, tray plastik, *mesh* ukuran 80, lampu *blue light* (450 – 485 nm) dan *white light* (380 – 700 nm) (SZMR, T5-8W), *blender* (Panasonic), oven (B-One), *shaker* (CH-64 Multishaker), kassa (Onemed), *cheese cloth*, kapas (Selection), alat sentrifugasi (Kokisan tipe H-103n), *micro sentrifuge* (Boeco tipe M-24A), *freezer* (GEA Freezer, Royal-Kincool®), vortex (Scilogex MX-S), penggaris (Philos), autoklaf (B-One), instrumen *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry-8045* (Shimadzu). *Software* SPSS.

3.2.2 Bahan

Kacang tanah (Situraja, Sumedang, Jawa Barat), larutan OTA 50 ppm dalam benzena: asam asetat (99:1) (CRM46912, Sigma Aldrich), aquades (Sakura Medical), asetonitril *grade* LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), asam asetat glasial (J.T. Baker), alkohol 70%, larutan natrium hipoklorit (Bayclin), metanol *grade* LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), H₂O *grade* LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), asam format *grade* LC-MS (Emsure®).

3.3 Bagan Alir Penelitian

Penelitian diawali dengan proses sterilisasi kacang dan *spiking* OTA menggunakan larutan OTA (asetonitril 10 % yang diasamkan dengan asam asetat 4%). Setelah dilakukan *spiking* OTA pada kacang tanah, kacang tanah dikecambahkan selama 3 hari menggunakan *germinator* pada RH 100 %. Perkecambahan dilakukan dengan 3 perlakuan yaitu perlakuan gelap, perlakuan dengan diberi cahaya biru, dan perlakuan dengan diberi cahaya putih selama perkecambahan dengan waktu 12 jam terang dan 12 jam gelap. Kecambah dikeringkan menggunakan penggiling kemudian diayak. Bubuk sampel diekstraksi menggunakan pelarut asetonitril, air, asam asetat (84:15:1). Tahap ekstraksi dibantu dengan menggunakan *shaker* dan sentrifugasi. Ekstrak yang dihasilkan dipindahkan ke dalam insert vial LC-MS untuk dianalisis menggunakan instrumen UHPLC-ESI-MS/MS dengan mode MRM dan didapatkan konsentrasi OTA pada sampel kemudian sampel dilakukan analisis UHPLC-ESI-MS/MS dengan mode PIS untuk melihat perubahan struktur OTA. Bagan alir penelitian bisa dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

3.4.1 Prosedur Penyimpanan Kacang Tanah

Kacang tanah (*Arachis hypogea* L) dipanen pada bulan Maret 2022, Situraja, Sumedang. Kacang hasil panen dilakukan pengupasan kulit luar kacang tanah dan disortir dengan cara 1) membuang kacang tanah yang kulitnya rusak, terserang hama dan berjamur; 2) memisahkan biji yang telah berubah warna, membusuk, pecah dan hilang dari kulit luar; 3) memisahkan biji yang berubah warna. Penyimpanan kacang tanah dilakukan pada -14°C , sebelum disimpan kacang tanah dilakukan *packing* menggunakan plastik PP kemudian dilakukan penyedotan udara menggunakan mesin *vacuum* dan dirapatkan menggunakan *sealer* agar tidak ada udara yang masuk (Indiarto & Rezaharsamto, 2020).

3.4.2 Preparasi Pelarut *Spiking* Okratoksin A

Pembuatan larutan *spiking* dilakukan dengan mengencerkan larutan OTA 50 ppm. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan pelarut *spiking* hingga konsentrasi mencapai 100 ppb (Zhao dkk., 2016). Berdasarkan hasil optimasi pelarut *spiking* yang digunakan yaitu asetonitril 10% dalam asam asetat 4% (99:1,v/v) (Pakfetrat dkk., 2019).

Pembuatan larutan standar OTA untuk pembuatan kurva standar dan analisis UHPLC-ESI-MS/MS dilakukan dengan mengencerkan larutan OTA 50 ppm menggunakan asetonitril: air: asam asetat (84:15:1, v/v/v) (Wang dkk., 2020) menjadi beberapa konsentrasi tertentu. Untuk pembuatan kurva kalibrasi digunakan konsentrasi 0, 15, 40, 90, 115 ppb. Kemudian dianalisis menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS.

3.4.3 Perkecambahan Kacang

Sebelum dilakukan perkecambahan kacang tanah harus melalui proses sterilisasi, kemudian dilakukan *spiking* OTA dan dilakukan perkecambahan.

3.4.3.1 Sterilisasi Kacang Tanah

Proses sterilisasi bertujuan untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan. OTA merupakan hasil produk dari jamur *Aspergillus* dan *Penicillium* sehingga keberadaan jamur pada penelitian ini tidak diharapkan. Optimasi konsentrasi larutan natrium hipoklorit dilakukan sebelum melakukan

tahap sterilisasi. Optimasi natrium hipoklorit dilakukan pada berbagai konsentrasi yaitu 1% (Magnoli dkk., 2007), 3% (Toffa dkk., 2013) dan 5% (Jalili dkk., 2010). Pertimbangan hasil optimasi sterilisasi kacang tanah yaitu dengan melihat pertumbuhan kacang tanah dan jamur.

Berdasarkan hasil optimasi sterilisasi didapatkan konsentrasi yang cocok untuk dilakukan perkecambahan yaitu pada konsentrasi 1%. Setelah diketahui konsentrasi yang cocok kemudian dilakukan sterilisasi pada kacang tanah dengan merendam kacang tanah sebanyak 10 g dengan larutan NaOCl 1% sebanyak 50 mL (Aisyah dkk., 2013) selama 2 menit. Kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 4 kali dengan cara dipindahtuangkan.

3.4.3.2 *Spiking* OTA pada Kacang Tanah

Spiking OTA menjadi hal yang penting dengan tujuan menambahkan OTA dalam kacang tanah. *Spiking* OTA dilakukan dengan perendaman, karena perendaman merupakan hal yang penting saat perkecambahan. Hal ini bertujuan untuk mengaktifkan kembali metabolisme pada kacang tanah. Pada tahap ini dilakukan optimasi jenis pelarut, konsentrasi dan metode *spiking* yang optimal. Optimasi jenis pelarut dan konsentrasi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol : air pada konsentrasi 4% dan 10% (Mehrafarin dkk., 2011), optimasi juga dilakukan pada asetonitril: air dalam asam asetat dengan konsentrasi asetonitril 10% dan 39 % (Oguz & Bozoglu, 2022; Pakfetrat dkk., 2019; Vita dkk., 2014). Pertimbangan pada optimasi jenis dan konsentrasi pelarut *spiking* yaitu pertumbuhan kacang tanah pada saat perkecambahan.

Optimasi metode *spiking* juga dilakukan agar mendapatkan OTA yang maksimal. Optimasi ini dilakukan dengan 1) kacang tanah steril direndam dengan larutan OTA selama 24 jam dengan bantuan *shaker* dan 2) kacang tanah steril dilakukan perendaman dengan aquades steril selama 24 jam kemudian dilakukan pemberian larutan OTA dengan cara dilakukan *spray* terhadap kacang tanah. Pemilihan metode ini mempertimbangkan pertumbuhan pada kacang tanah dan kuantitas OTA yang menempel pada kacang tanah. Kuantitas OTA yang menempel dianalisis menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS.

Berdasarkan hasil optimasi jenis, konsentrasi dan metode *spiking*, didapatkan pelarut asetonitril:air 10 % dalam asam asetat dan metode perendaman

untuk *spiking* menjadi yang paling optimal untuk dilakukan. Kemudian OTA dilakukan *spiking* dengan merendam kacang tanah dengan pelarut asetonitril:air 10 % dalam asam asetat selama 24 jam dalam keadaan gelap dengan bantuan *shaker* pada kecepatan 80 rpm agar OTA dapat terdistribusi dengan baik (Pakfetrat dkk., 2019). Pelarut *spiking* OTA yang digunakan yaitu perbandingan pelarut *spiking* dan kacang tanah sebanyak 1 : 1 (Maul dkk., 2012).

3.4.3.3 Proses Perkecambahan Kacang Tanah

Merode perkecambahan diadopsi dari sumber (Ardiantika, 2019). Perkecambahan kacang tanah dilakukan dalam mesin kecambah (*germinator*) yang dimodifikasi (Aisyah dkk., 2013). Aspek yang dikontrol dalam proses ini yaitu kelembaban, suhu dan intensitas cahaya. Pada perkecambahan kelembaban yang optimal itu pada 70 – 98 % (Sawant dkk., 2012; Xiao dkk., 2021). Kelembaban pada *germinator* penelitian ini dihasilkan dari *fogger* yang menghasilkan kabut setiap 3 jam dengan durasi 15 menit. Selama periode ini, kipas yang terpasang pada mesin kecambah mendistribusikan kabut secara homogen dengan frekuensi 4 detik per 20 detik. Sedangkan suhu pada *germinator* ini dihasilkan dari *heating mat* yang diletakkan di bawah mesin. Suhu yang optimal dalam perkecambahan yaitu pada suhu 25 - 30°C (Sawant dkk., 2012; Xiao dkk., 2021).

Biji kacang tanah dilakukan perkecambahan dengan (1) perkecambahan kacang tanah dalam gelap, (2) perkecambahan kacang tanah dalam terang. Sebagai kontrol yaitu kacang tanah yang diberi OTA tanpa *treatment*. Cahaya yang digunakan pada penelitian ini yaitu cahaya *fluorescent tube*, *blue light* (455 nm) dan *white light* (470 nm) dengan intensitas 200 lux dengan kontrol waktu 12 jam gelap/12 jam terang, pada jenis dan intensitas lampu ini dapat menghambat pertumbuhan jamur dan mendegradasi OTA dengan baik (Schmidt-Heydt dkk., 2010, 2011b, 2012). Pada tahap ini yang menjadi pertimbangan penting adalah pertumbuhan kecambah saat proses perkecambahan sehingga dibutuhkan parameter sebagai acuan pertumbuhan kecambah. Parameter pertumbuhan perkecambahan kacang tanah dilihat dari pertumbuhan radikula dan plumula (Rajjou dkk., 2006) dilakukan dengan mengukur panjang hipokotil dan menghitung persentasi jumlah kacang tanah yang mengalami pertumbuhan plumula. Panjang

hipokotil diukur menggunakan penggaris. Jumlah kacang ditentukan dengan cara perhitungan sampling secara acak ($p \geq 90\%$).

$$\text{Persentase pertumbuhan plumula} = \frac{\text{Kacang tanah dengan plumula}}{\text{Total kacang tanah}} \times 100\%$$

Pada tahap perkecambahan dilakukan optimasi lama perkecambahan. Hal yang dipertimbangkan dalam optimasi ini adalah tumbuhnya kacang tanah dan jamur. Optimasi ini dilakukan dengan cara kacang tanah yang telah ditambahkan dengan larutan OTA 100 ppb (asetonitril:air 10 % dalam asam asetat 4%) dikecambahkan dalam gelap pada suhu 25°C dan RH 100% menggunakan germinator.

Setelah didapatkan hari yang optimal maka dilakukan proses perkecambahan. Kacang yang telah direndam kemudian dimasukkan ke dalam box plastik yang sudah disterilkan menggunakan larutan NaOCl 0,07 % dan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam *germinator*. Sebelum digunakan, *germinator* disterilisasi dengan dipaparkan lampu UV selama 15 menit, kemudian disemprotkan alkohol 70% dan disemprotkan larutan NaOCl 0,07% ke seluruh bagian alat lalu didiamkan selama 15 menit (Ardiantika, 2019). Perkecambahan dilakukan selama 3 hari pada suhu 25°C dan 100% RH kemudian disampling. Kecambah kacang tanah disimpan pada suhu -14°C untuk dianalisis lebih lanjut. Berikut kesimpulan perbedaan perlakuan pada kacang tanah (**Tabel 3.1**).

Tabel 3.1 Kesimpulan perlakuan pada kacang tanah

Perlakuan	Tahapan					
	Sterilisasi	Perendaman	OTA	Perkecambahan	Blue Light	White Light
UG	✓	✓				
UG _{OTA}	✓	✓	✓			
GG _{OTA}	✓	✓	✓	✓		
GLB _{OTA}	✓	✓	✓	✓	✓	
GLW _{OTA}	✓	✓	✓	✓		✓

Keterangan

- UG_{OTA} : *Ungermination* + OTA
- GG_{OTA} : Germinasi Gelap + OTA
- GLB_{OTA} : Germinasi *Light Blue* + OTA
- GLW_{OTA} : Germinasi *Light White* + OTA

3.4.4 Analisis Okratoksin A

Analisis Okratoksin A pada kecambah kacang tanah melalui beberapa tahap diantaranya ekstraksi dan analisis OTA menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS.

3.4.4.1 Ekstraksi Okratoksin A pada Kecambah Kacang Tanah

Prosedur ekstraksi OTA diadopsi dari (Soleimany dkk., 2012) dengan beberapa modifikasi. Kecambah kacang tanah hasil perkecambahan kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam (Maul dkk., 2012). Kemudian dilakukan penggilingan menggunakan *blender* dan disaring menggunakan mesh 80. Bubuk kacang tanah sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL kemudian ditambahkan pelarut asetonitril:air:asam asetat (84:15:1) sebanyak 4 mL. Ekstraksi dilakukan 2 kali dengan menambahkan pelarut 2 mL pada 1 gram bubuk kacang tanah lalu dicampurkan menggunakan vorteks untuk memastikan pelarut telah tercampur dengan sempurna. Kemudian, campuran sampel dan pelarut ekstraksi diaduk menggunakan *shaker* selama 1 jam lalu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil kemudian residu yang tersisa ditambahkan kembali pelarut ekstraksi sebanyak 2 mL lalu dilakukan langkah ekstraksi ulang. Supernatan yang dihasilkan dari proses ekstraksi pertama dan kedua kemudian digabung dan dilakukan kembali sentrifugasi untuk memastikan tercampur dengan baik dan tidak ada residu. Hasil gabungan supernatan kemudian dimasukkan ke dalam *insert vial* 250 µL untuk dianalisis lebih lanjut.

3.4.4.2 Analisis Penurunan dan Produk Modifikasi Okratoksin A menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS

Analisis OTA dilakukan menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS spektrometer massa *Triple Quadrupole* yang dilengkapi dengan sumber *electrospray ionization* (ESI) yang digabungkan ke sistem UHPLC. Pemisahan kromatografi dilakukan pada kolom *Kinetex* (2,6 µm C18 x 2,1 mm) menggunakan fasa gerak mengandung eluen A (0,1 % Asam format) dan eluen B (0,1% asam format dalam asetonitril) dengan mode gradien 70% A menit ke 0, 5% A menit ke 3-4, 70% A menit ke 4,01 – 6. Laju alir fasa gerak pada 400 µL/min dan diinjeksi sebanyak 5 µL.

Deteksi MS/MS, menggunakan ESI positif dengan pengaturan *interface temperature* 300°C, *desolvation temperature* 526°C, *DL temperature* 250°C, *nebulizing gas flow* 2,80L/min, *heating gas flow* 10,00 L/min, *heat block* 400°C, *drying gas flow* 10,00 L/min. Akuisisi data dengan mengaplikasikan *multiple reaction monitoring* (MRM) dengan *dwelt time* 100 ms untuk analisis kuantifikasi OTA. Sedangkan untuk analisis mekanisme penurunan OTA dapat dilihat dari perubahan struktur OTA. Perubahan struktur OTA dianalisis menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS dengan menggunakan metode analisis *Product Ion Scan* (PIS) pada ESI positif dan negatif pada rentang 100-1000 m/z.

3.4.4.3 Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menghitung kurva standar dengan tujuan untuk dijadikan sebagai acuan dalam perhitungan konsentrasi OTA pada sampel. Dari kurva standar tersebut dapat ditentukan *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ) untuk melihat batas deteksi dan kuantifikasi jumlah atau konsentrasi OTA terkecil yang dapat terdeteksi dan ditentukan . Kurva standar dievaluasi menggunakan 6 konsentrasi standar OTA yaitu pada 0, 15, 40, 90, 115 ppb. Nilai LOD dan LOQ dihitung berdasarkan standar deviasi perpotongan y dan kemiringan (*slope*) yaitu sebagai berikut.

$$LOD = 3,3 \times \frac{\text{standar deviasi respons}}{\text{slope}}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\text{standar deviasi respons}}{\text{slope}}$$

Selain itu, analisis statistik juga melakukan pengolahan data terhadap data pertumbuhan kacang tanah, penurunan serta modifikasi OTA dalam sampel kacang tanah. Evaluasi signifikansi perbedaan konsentrasi OTA dalam sampel dengan cahaya dan tanpa cahaya, dilakukan dengan cara membandingkan rata-rata konsentrasi OTA pada setiap sampel menggunakan *One-way analysis of variance* (ANOVA) dan Uji *multiple range* Duncan, dimana $P < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik. Grafik dilakukan *plotting* menggunakan Software OriginPro 9.65 (Zhu dkk., 2020).