

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan selama lima bulan, yaitu dari bulan Maret hingga Juli 2023 dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan optimasi perkecambahan, perkecambahan sampel dengan dan tanpa perlakuan iradiasi UV-C, pengeringan menggunakan oven, penepungan, dan ekstraksi.
- 2) Laboratorium Kimia Instrumen Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan analisis OTA pada ekstrak sampel menggunakan instrumentasi UHPLC-ESI-QQQ dengan metode MRM untuk kuantifikasi OTA dan PIS untuk identifikasi senyawa modifikasi OTA.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

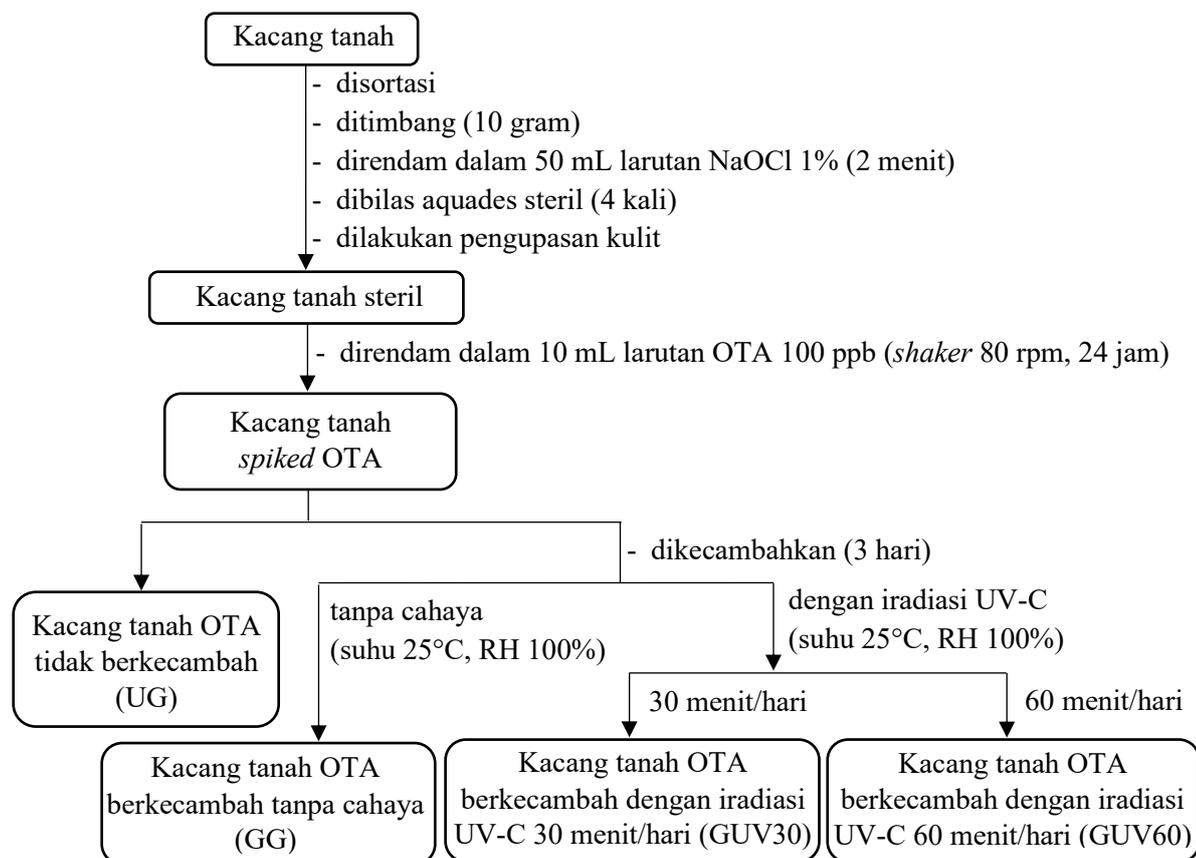
Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya kain kasa (Onemed), kapas (Selection), autoklaf (B-One), spatula, neraca analitik (Mettler Toledo ME204), gelas kimia 100 mL dan 400 mL (Pyrex), batang pengaduk, gelas ukur 10 mL dan 50 mL (pyrex), corong kaca, pipet, tabung falcon 15 mL dan 50 mL (Onemed), labu ukur 50 mL, 100 mL dan 250 mL (Pyrex), mikropipet 1-200  $\mu\text{L}$  (Mettler Toledo), 1-10  $\mu\text{L}$ , 10 – 100  $\mu\text{L}$ , 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , dan 1000-5000  $\mu\text{L}$  (Dragon Lab), *white tip* mikropipet 10  $\mu\text{L}$ , *yellow tip* mikropipet 200  $\mu\text{L}$ , dan *blue tip* mikropipet 300-5000  $\mu\text{L}$  (MF Lab), *shaker* (CH-64 Multishaker), *cheese cloth*, *tray* plastik, alat perkecambahan berupa *germinator* yang dilengkapi *heating mat* 12 V (Hyindoor), *humidifier* DC 12 V, dan *mini fan* DC 12 V, sensor suhu, box UV dengan lampu UV-C (100-280 nm) 15 W (Yang), oven (B-One), blender, ayakan 80 *mesh*, vortex (Scilogex MX-S), *centrifuge* (Kokisan H-103n), *micro centrifuge* (Boeco Tipe M-24A), *epENDORF tube* 1,5 mL (Onemed), rak *epENDORF tube* 1,5 mL, blender (Panasonic), *insert vial* LC-MS, *freezer* (GEA freezer, Royal-Kincool®), dan instrumentasi UHPLC-ESI-QQQ (Shimadzu 8045).

### 3.2.2 Bahan

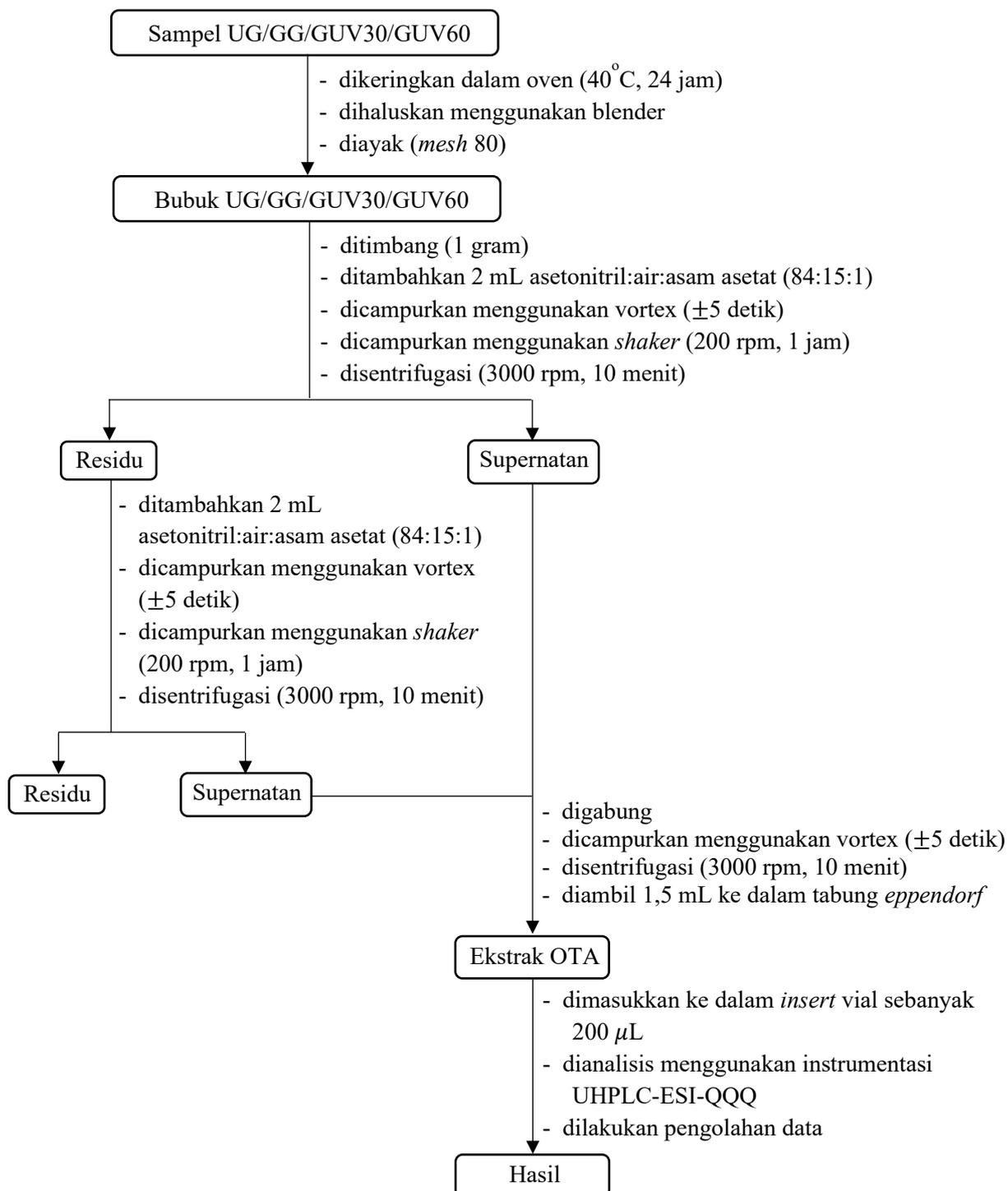
Penelitian ini menggunakan kacang tanah yang baru dipanen pada bulan Maret 2023 di Situraja, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini diantaranya larutan OTA 50 ppm (50000 ppb) dalam benzena:asam asetat (99:1) (Sigma-Aldrich), larutan hipoklorit (Bayclin), alkohol 70%, aquades (Sakura Medical), asetonitril *grade* LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), asam asetat glasial (J.T. Baker), asam format *grade* LC-MS (Emsure®), H<sub>2</sub>O *grade* LC-MS (LiChrosolv®, Supelco), dan metanol *grade* LC-MS (LiChrosolv®, Supelco).

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

Penelitian ini terdiri dari tiga tahapan utama, yaitu: (1) perkecambahan, meliputi tahap sterilisasi, perendaman/*spiking* OTA, perkecambahan tanpa dan dengan iradiasi UV-C; (2) ekstraksi OTA; dan (3) analisis OTA. Tahapan perkecambahan ditunjukkan pada **Gambar 3.1**. Adapun tahapan ekstraksi dan analisis OTA ditunjukkan pada **Gambar 3.2**.



**Gambar 3.1** Tahapan sterilisasi, *spiking* OTA, dan perkecambahan tanpa dan dengan iradiasi UV-C.



**Gambar 3.2** Tahapan ekstraksi dan analisis OTA.

### 3.4 Tahapan Penelitian

#### 3.4.1 Penyimpanan Kacang Tanah

Penelitian ini menggunakan kacang tanah yang baru dipanen sehingga diperlukan kondisi penyimpanan yang sesuai untuk menjaga kualitas kacang tanah hingga digunakan untuk penelitian. Cara penyimpanan kacang tanah mengacu pada penelitian (Indiarto & Rezaharsanto, 2020). Sebelumnya, kacang tanah disortir terlebih dahulu dengan cara memisahkan kacang tanah yang kulitnya rusak, terserang hama dan berjamur, bijinya telah berubah warna, membusuk, pecah dan hilang dari kulit testa. Kacang tanah yang telah disortir dikemas dalam kemasan vakum dan disimpan pada suhu di bawah 18°C.

#### 3.4.2 Optimasi Perkecambahan

##### 3.4.2.1 Optimasi Sterilisasi Kacang Tanah

Optimasi sterilisasi kacang tanah dilakukan dengan menggunakan berbagai konsentrasi larutan NaOCl, diantaranya NaOCl 1% (Aisyah et al., 2013), 3% (Toffa et al., 2013), dan 5% (Jalili et al., 2010). Kacang tanah direndam dalam masing-masing larutan NaOCl selama 2 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak empat kali dan dikupas kulitnya (Aisyah et al., 2013; Toffa et al., 2013). Volume NaOCl yang digunakan sebesar 5 L/kg biji (Aisyah et al., 2013). Pada optimasi ini digunakan 3 gram biji yang direndam dalam 15 mL NaOCl. Kacang tanah tanpa kulit yang telah disterilisasi kemudian direndam dalam aquades steril selama 24 jam kemudian dikecambahkan di dalam *germinator*. Pertumbuhan kecambah kacang tanah menjadi parameter penentuan konsentrasi NaOCl yang optimal untuk sterilisasi.

##### 3.4.2.2 Optimasi *Spiking* OTA

Optimasi *spiking* OTA meliputi optimasi pelarut dan cara *spiking* OTA. Pelarut *spiking* yang digunakan dalam tahap ini diantaranya metanol 4% dan 10% (Mehrafarin et al., 2011) juga asetonitril 39% dan 10% yang diasamkan dengan 4% asam asetat (Oğuz & Bozoğlu, 2022; Vita et al., 2014). *Spiking* pelarut tersebut ke kacang tanah dilakukan dengan dua cara, yaitu perendaman 24 jam (Maul et al., 2012) menggunakan *shaker* 80 rpm (Pakfetrat et al., 2019 dengan modifikasi) dan *spray* (modifikasi). *Spray* dilakukan setelah kacang tanah direndam aquades steril

selama 24 jam menggunakan *shaker* 80 rpm. Selanjutnya, kacang tanah *spiked* OTA dikecambahkan selama 3 hari. Pelarut dan cara *spiking* OTA yang optimal ditentukan berdasarkan besarnya persen perkecambahan.

### 3.4.3 Perkecambahan Kacang Tanah

Tahapan perkecambahan kacang tanah terdiri dari tahapan sterilisasi, perendaman/*spiking* OTA, perkecambahan tanpa dan dengan adanya iradiasi UV-C.

#### 3.4.3.1 Sterilisasi

Sterilisasi kacang tanah menggunakan NaOCl dengan konsentrasi yang digunakan berdasarkan hasil optimasi. Kacang tanah disterilkan dengan cara merendamnya dalam larutan NaOCl 1% (5 L/kg biji) selama 2 menit pada suhu kamar, kemudian dibilas dengan aquades yang telah disterilkan (pada suhu 120°C, 60 menit) sebanyak 4 kali. Selanjutnya, kulit kacang tanah dikupas untuk memaksimalkan penyerapan OTA ke dalam kacang tanah.

#### 3.4.3.2 *Spiking* Okratoksin A

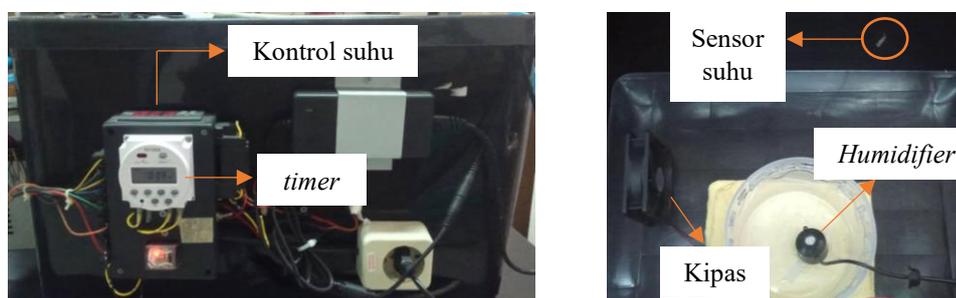
Secara umum, tahapan *spiking* OTA merujuk pada penelitian Pakfetrat et al. (2019) dan Maul et al. (2012) dengan modifikasi berdasarkan hasil optimasi. Larutan OTA 50000 ppb dalam benzena:asam asetat (99:1) diencerkan terlebih dahulu dengan asetonitril:air:asam asetat (9,9:90,06:0,04) menjadi 100 ppb. Biji kacang tanah yang telah steril ditambahkan 100 ppb larutan OTA, kemudian dilakukan pencampuran menggunakan *shaker* (80 rpm) selama 24 jam dalam kondisi gelap.

#### 3.4.3.3 Kondisi Perkecambahan Kacang Tanah

##### 3.4.3.3.1 Alat Perkecambahan (*Germinator*)

Perkecambahan kacang tanah dilakukan dalam alat perkecambahan (*germinator*) skala laboratorium yang telah dibuat dan dioptimasi oleh Aisyah et al. (2013). Sebelum digunakan, *germinator* disterilisasi terlebih dahulu menggunakan lampu UV selama 15 menit, kemudian disemprotkan NaOCl 0,07% (v/v) dan alkohol 70% ke seluruh bagian *germinator*, masing-masing didiamkan selama 15 menit (Ardiantika, 2019). Selanjutnya, kelembaban dan suhu dikontrol dalam

*germinator*. Kontrol kelembaban diatur dengan mengatur waktu nyala *humidifier* dan kipas pada *germinator* menggunakan *microtimer*. Menurut Ardiantika (2019), kondisi optimum perkecambahan dicapai dengan cara mengatur *humidifier* dan kipas setiap 3 jam dengan durasi 5 menit. *Humidifier* yang ditempatkan dalam kompartemen air akan mengkonversi air menjadi kabut air. Selama *humidifier* menyala, sebuah kipas di dalam *germinator* mendistribusikan kabut air ke seluruh area *germinator*. Lingkungan perkecambahan dijaga pada suhu 25°C menggunakan *heat mat* disertai termostat yang diletakkan di bawah *germinator*. Sensor termometer dipasang di dalam *germinator* untuk mengetahui suhu selama waktu perkecambahan. Pengaruh cahaya dari luar dapat dihindari dengan menggunakan box *germinator* berwarna hitam. **Gambar 3.3** menunjukkan skema alat *germinator* yang digunakan dalam penelitian ini.



**Gambar 3.3** Skema alat *germinator*.

#### 3.4.3.2 Kondisi Perkecambahan

Perkecambahan berlangsung selama 3 hari berdasarkan hasil penelitian Pakfetrat et al. (2019) yang menunjukkan penurunan OTA signifikan pada hari ke-3 perkecambahan. Pada penelitian ini, perkecambahan dilakukan dengan ada atau tidaknya iradiasi UV-C. Iradiasi UV-C diterapkan dengan variasi waktu paparan. Waktu paparan radiasi UV-C merujuk pada hasil penelitian Ameer Sumbal et al. (2016), yaitu selama 30 dan 60 menit per hari. **Tabel 3.1** menunjukkan beberapa sampel kacang tanah yang dibuat dalam penelitian ini, diantaranya kacang tanah OTA tanpa perlakuan (un-germinasi, UG), kacang tanah OTA yang dikecambahkan tanpa cahaya (germinasi gelap, GG), kacang tanah OTA yang dikecambahkan dengan iradiasi UV-C 30 menit per hari (GUV30), dan kacang tanah OTA yang dikecambahkan dengan iradiasi UV-C 60 menit per hari (GUV60).

**Tabel 3.1** Ringkasan perbedaan perlakuan pada kacang tanah

Perlakuan	Tahapan			
	Perendaman/ <i>spiking</i> (1 hari)	Perkecambahan (3 hari)		
		Gelap	Iradiasi UV-C	
			30 menit/hari	60 menit/hari
UG	√	-	-	-
GG	√	√	-	-
GUV30	√	√	√	-
GUV60	√	√	-	√

Kacang tanah yang telah direndam dalam larutan OTA diletakkan di atas *tray* plastik yang dilapisi *cheese-cloth* steril (diautoklaf pada 120°C, 60 menit) kemudian dimasukkan ke dalam box *germinator*. Kacang tanah dikecambahkan selama 3 hari pada suhu 25°C dan RH 100%. Perlakuan iradiasi UV-C dilakukan di dalam box UV-C dengan jarak lampu 225 mm dari permukaan sampel.

#### 3.4.3.4 Pengeringan dan Penepungan

Seluruh sampel (UG, GG, GUV30, GUV60) dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Sampel yang telah kering dihaluskan menggunakan blender, kemudian diayak menggunakan ayakan berukuran 80 *mesh*. Sampel hasil penyaringan disimpan di *freezer* untuk proses analisis selanjutnya.

#### 3.4.4 Preparasi Standar

Pembuatan kurva standar OTA menggunakan serangkaian konsentrasi standar OTA antara lain 0, 15, 40, 90, dan 115 ppb. Deret konsentrasi standar tersebut dihasilkan dari pengenceran 50000 ppb OTA dalam benzena:asam asetat (99:1) menggunakan asetonitril:air:asam asetat (84:15:1). Masing-masing konsentrasi divortex sebelum diinjeksikan ke dalam instrumentasi UHPLC-ESI-QQQ.

#### 3.4.5 Preparasi Sampel

Prosedur ekstraksi OTA merujuk pada penelitian Soleimany et al. (2012) dengan modifikasi. Sebanyak 1 gram sampel kacang tanah bubuk ditambahkan 2 mL asetonitril:air:asam asetat (84:15:1) (Zhao et al., 2021). Kemudian, campuran diaduk menggunakan vortex selama  $\pm 5$  detik dan *shaker* (200 rpm) selama 1 jam. Selanjutnya, campuran disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan

yang diperoleh diambil sebanyak 1,5 mL dan residu diekstraksi kembali dengan tahapan seperti sebelumnya. Supernatan yang diperoleh dari ekstraksi kedua diambil 1,5 mL dan digabungkan dengan supernatan pertama. Gabungan supernatan diaduk kembali menggunakan vortex, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi diambil sebanyak 1,5 mL ke dalam tabung *ependorf* dan dimasukkan ke dalam *insert vial* sebanyak 200  $\mu$ L untuk selanjutnya dilakukan analisis menggunakan instrumentasi UHPLC-ESI-QQQ.

#### 3.4.6 Analisis OTA Menggunakan UHPLC-ESI-QQQ

Ekstrak OTA dianalisis menggunakan UHPLC-ESI-QQQ (Shimadzu 8045). Sampel (5  $\mu$ L) diinjeksikan ke dalam kolom Kinetex® 2,6  $\mu$ m C18, 100 Å, 50 x 2,1 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) dengan oven kolom dikontrol pada 30°C. Air (A) dan asetonitril (B) yang diasamkan dengan asam format 0,1% digunakan sebagai pelarut yang mengelusi sampel dengan laju alir 400  $\mu$ L/menit. Profil elusi gradien diterapkan sebagai berikut: 0–3 menit, gradien linier dari 30% hingga 95% (v/v) B; 3–4 menit, isokratik pada 95% (v/v) B; 4–4,01 menit, gradien linier dari 95% hingga 30% (v/v) B; 4.01-6 menit, isokratik pada 30% (v/v) B.

Analisis spektrometri massa tandem (*triple quadrupole/*QQQ) dengan sumber ionisasi *electrospray* (ESI) dioperasikan dalam mode ESI positif dengan suhu desolvasi 526°C dan aliran *nebulizer* 2,8 L/menit. OTA dideteksi dalam mode *multiple reaction monitoring* (MRM) dari ion-ion terpilih pada quadrupole pertama (Q<sub>1</sub>) dan ketiga (Q<sub>3</sub>). Pola fragmentasi m/z (Q<sub>1</sub>) → m/z (Q<sub>3</sub>) analit diperoleh dari spektrum massa pemindaian ion produk larutan standar OTA. Transisi kuantifikasi OTA dalam mode ini adalah (m/z) 404.1 → 238.85 (CE -24 eV). Adapun transisi yang digunakan untuk konfirmasi OTA antara lain (m/z) 404,10 → 358,00 (CE -15 eV) dan 404,10 → 221,00 (CE -39 eV). Analisis lebih lanjut dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa modifikasi OTA akibat perlakuan perkecambahan dan iradiasi UV-C menggunakan metode *Product Ion Scan* dalam mode ESI positif dengan rentang m/z 100-1000.

#### 3.4.7 Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan *Microsoft Excel* untuk menentukan linearitas, sebagai salah satu parameter keberterimaan metode analisis

yang digunakan, dan besarnya konsentrasi OTA dalam sampel. Linearitas ditentukan dari kurva standar hasil pengukuran deret standar OTA dengan konsentrasi 0, 15, 40, 90, dan 115 ppb menggunakan instrumentasi UHPLC-ESI-QQQ. Adapun konsentrasi OTA dalam sampel dihitung dengan cara interpolasi data area sampel ke dalam persamaan regresi kurva standar.

Analisis statistik lainnya dilakukan menggunakan Statistik SPSS (versi 26, IBM, Armonk, NY, USA) untuk mengevaluasi signifikansi ( $P < 0,05$ ) perbedaan persentase penurunan OTA antar perlakuan melalui uji perbandingan berganda *post hoc Tukey*.