

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama kurang lebih empat bulan, dimulai dari bulan Maret hingga Juli 2023 serta berlangsung pada berbagai tempat dengan rincian kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan preparasi, *spiking*, perkecambahan, elisitasi, serta ekstraksi sampel kacang tanah.
- 2) Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia untuk melakukan analisis ekstrak sampel menggunakan instrumentasi UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam preparasi hingga proses perkecambahan yaitu gelas ukur (10 mL; 50 mL), labu erlenmeyer 100 mL, labu ukur (100 mL; 250 mL), pipet volumetri 10 mL, *ball pipet*, mikropipet 1-10 μL , 1-100 μL , 1000-5000 μL (Dragon Lab) dan 1-200 μL (Gilson Mettler Toledo), *white tip* mikropipet 10 μL (MF Lab), *white tip* mikropipet 5000 μL (MF Lab), *yellow tip* mikropipet 200 μL (MF Lab), *falcon tube* 50 mL (Nest), batang pengaduk, pipet tetes, corong kaca, pinset, spatula, cawan petri plastik, neraca analitik (Mettler Toledo ME204), *shaker* (CH-64 Multi-shaker), lemari pendingin (GEA freezer Royal-Kincool), *tray* perkecambahan, alat perkecambahan atau germinator yang dilengkapi dengan *heating mat* 12 V, *fog generator* (humidifier) DC 12 V, *mini fan* DC 12 V (Happy), piring aluminium, serta oven (B-One). Proses ekstraksi dan analisis menggunakan alat penggiling bumbu atau *blender* (Miyako), saringan 80 mesh, tabung falcon 15 mL dan 50 mL (Nest), vortex (Scigolex MX-S), sentrifuge (Kokusen H-103N), mikro sentrifuge (Boeco tipe M-24A), mikropipet 1000-5000 μL (Dragon Lab), PCR tube 1,5 mL (OneMed), *blue tip* mikropipet μL , *white tip*

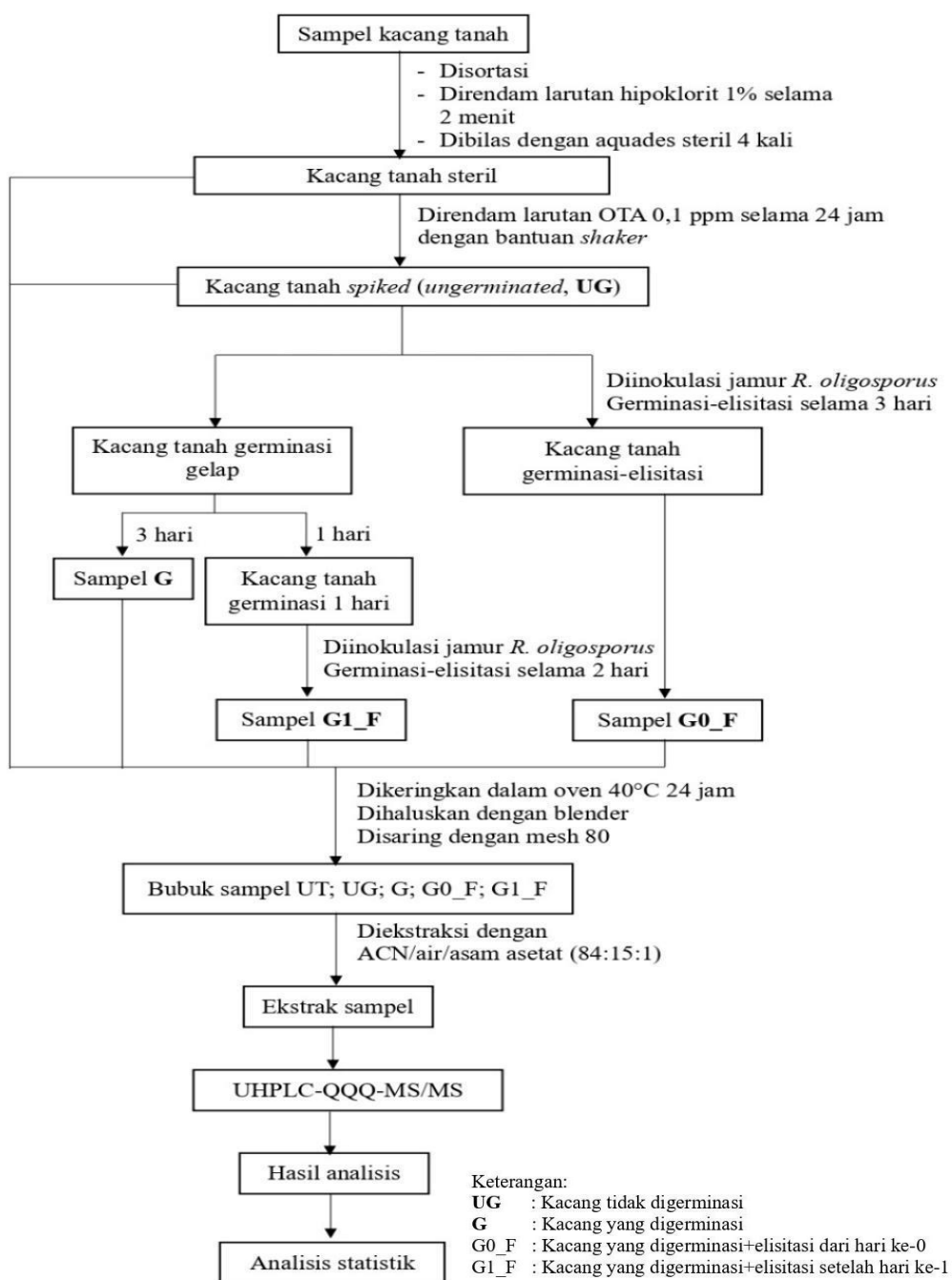
mikropipet μL , *yellow tip* mikropipet 200 μL (MF Lab), *syringe* 3 mL, *micro-insert* untuk autosampler 250 μL , botol vial LCMS 1,5 mL, instrumentasi UHPLC-ESI-
QQQ-MS/MS (Shimadzu LCMS-8045)

3.2.2. Bahan

Kacang tanah (*Arachis hypogea* L.) sebagai sampel yang akan dianalisis dalam penelitian ini berasal dari Sumedang Jawa Barat, bubuk jamur tempe *Rhizopus oligosporus* yang diproduksi dari PT. Aneka Fermentasi Indonesia, standar okratoksin A (SigmaAldrich CRM46912), larutan hipoklorit 5,25%, *cheese cloth*, akuades, alkohol teknis, air grade LC-MS, asam asetat glasial (J.T.Baker), asetonitril *grade* LC-MS (Fulltime), asam format *grade* LC-MS (Fulltime).

3.3. Tahapan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini (Gambar 3.1) diadopsi dari beberapa penelitian yang telah dimodifikasi. Prosedur kerja pada penelitian ini terdiri dari lima tahap utama diantaranya, preparasi, penambahan toksin perkecambahan, perkecambahan dengan elisitasi, ekstraksi, serta analisis kandungan OTA.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Preparasi sampel

Sampel kacang tanah diperoleh dari Situraja, Sumedang, Jawa Barat yang dipanen dalam kondisi segar langsung dari lahan pertanian dengan usia sekitar 3-5 bulan. Kacang tanah segar disortir untuk memisahkan kacang dengan kondisi yang rusak dari awal di lahan. Kacang hasil sortir pertama diletakkan dalam penampang yang luas dan disimpan dalam suhu ruang. Kemudian, dikupas bagian cangkang atau kulit luar kacang. Kacang tanpa kulit luar disortir untuk mencegah kontaminasi silang dari kacang yang rusak.

Kacang tanah disimpan di dalam plastik tertutup pada *freezer* dengan suhu di bawah 0°C . Preparasi sampel diawali dengan memilih (*sortir*) kacang dengan kriteria ukuran yang seragam dan tidak keriput. Sampel yang akan diberi perlakuan dan dianalisis ditimbang sebanyak 10 gram sebagai massa yang sama untuk setiap variabel percobaan. Secara keseluruhan, terdiri dari 4 sampel percobaan yang akan dianalisis.

3.4.2 Optimasi Tahap Sterilisasi Kacang Tanah

Tahap optimasi sterilisasi dilakukan untuk memilih konsentrasi natrium hipoklorit (NaOCl) yang efektif dalam mempertahankan permukaan biji kacang dari berbagai bakteri dan jamur selama perkecambahan berlangsung. Berdasarkan beberapa literatur, konsentrasi NaOCl yang digunakan dalam studi mikotoksin diantaranya NaOCl 1%, NaOCl 3%, dan NaOCl 5% sebagai konsentrasi yang akan dioptimasi (Embaby et al., 2013; Jalili et al., 2010; Toffa et al., 2013). Perendaman oleh NaOCl dilakukan pada suhu ruang selama 2 menit seperti yang dilakukan oleh Toffa et al., (2013) pada matriks yang sama yaitu kacang tanah.

3.4.3 Optimasi Tahap Penambahan OTA

3.4.3.1 Optimasi Pelarut *Spiking*

Larutan standar OTA dilarutkan dalam beberapa pilihan pelarut yang diadopsi dari berbagai penelitian dengan modifikasi konsentrasi. Standar OTA dilarutkan dalam larutan metanol 4% dalam air, larutan metanol 10% dalam air (Mehrafarin *et al.*, 2011), larutan asetonitril 10% dalam air dengan 4% asam asetat dan larutan asetonitril 39% dalam air dengan 4% asam asetat (Oğuz & Bozoğlu,

2022; Vita *et al.*, 2014). Pelarut OTA hasil optimasi dipilih berdasarkan pada sampel kacang tanah dengan persentase pertumbuhan kecambah paling tinggi.

3.4.3.2 Optimasi Metode *Spiking*

Tahap optimasi ini dilakukan untuk memilih metode penambahan OTA dengan pertimbangan OTA dapat terdistribusi dan terserap maksimal ke dalam sampel. Metode *spiking* diadopsi dari penelitian yang telah dilakukan oleh Maul *et al.*, (2012) dan Pakfetrat *et al.*, (2019) dengan modifikasi. Metode penambahan larutan OTA pada kacang tanah dilakukan dengan dua cara yaitu, 1) merendam kacang tanah dengan larutan OTA dalam kondisi digoyangkan selama 24 jam atau disebut perendaman OTA secara langsung; dan 2) merendam kacang tanah dengan aquades dalam kondisi digoyangkan selama 24 jam kemudian bagian permukaan kacang yang telah direndam lalu disemprot dengan larutan OTA dengan konsentrasi yang sama atau disebut sebagai metode semprot. Sampel optimasi ini kemudian dianalisis melalui instrumen UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS untuk memperoleh data OTA yang menempel pada sampel kacang tanah secara kuantitatif. Dalam setiap percobaan, *spiking* dilakukan dengan perbandingan 1 : 1 antara volume perendaman terhadap massa biji kacang tanah dalam keadaan gelap pada suhu ruang.

3.4.4 Larutan Standar OTA

Sediaan larutan standar OTA 50 ppm berada dalam benzena:asam asetat (99/1) 1 mL. Standar OTA dilarutkan dalam pelarut yang dipilih berdasarkan hasil optimasi yang telah dilarutkan. Larutan standar OTA dilarutkan dalam sejumlah volume pelarut asetonitril 10% dalam air dengan asam asetat 4% (198 : 2) untuk mencapai konsentrasi *spiking* OTA 0,1 ppm. Seri pengenceran standar OTA 50 ppm dibuat dalam pelarut asetonitril/air/asam asetat (84:15:1) untuk mencapai konsentrasi deret standar kurva kalibrasi 0,015 ppm; 0,04 ppm; 0,09 ppm; 0,115 ppm.

3.4.5 Perkecambahan

3.4.5.1 Alat perkecambahan

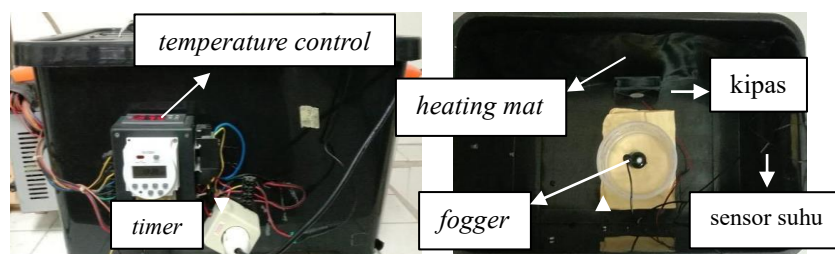
Perkecambahan dilakukan dalam alat perkecambahan (germinator) yang telah dioptimasi oleh (Ardiantika, 2019). Germinator berupa box berwarna hitam yang bertujuan untuk menghindari cahaya dari luar (Gambar 3.2). Faktor yang

dikontrol diantaranya kelembaban dan suhu. Kontrol kelembaban diatur

PENGARUH PERKECAMBAHAN DAN KOMBINASI PERKECAMBAHAN-ELISITASI MENGGUNAKAN JAMUR *Rhizopus sp.* TERHADAP PENURUNAN OKRATOKSIN A PADA KACANG TANAH

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

menggunakan *timer* dengan mengatur nyala *fog generator* (24 V) yang menghasilkan kabut air. Kipas bekerja selama *fog generator* menyala dan berfungsi untuk mendistribusikan kabut air ke seluruh area germinator.



Gambar 3.2 Skema alat perkecambahan (germinator)

Hasil optimasi menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk perkecambahan diperoleh dengan mengatur nyala *fog generator* dan kipas setiap 3 jam dengan durasi 5 menit. Sedangkan, kondisi optimum perkecambahan-elisitasi jamur dapat dicapai dengan mengatur nyala *fog generator* dan kipas setiap 5 jam dengan durasi 2 menit. Suhu dikontrol oleh *temperature control* dalam rentang 25-30°C dengan bantuan *heat mat* (*Hyindoor* 12 V) yang diletakkan di bagian dasar permukaan germinator. Sensor suhu dipasang di dalam germinator untuk mengetahui suhu selama waktu perkecambahan. Sebelum digunakan, germinator disterilisasi menggunakan UV selama 15 menit serta disemprotkan alkohol 70% dan larutan hipoklorit (NaOCl) 0,07% (v/v) ke seluruh bagian germinator kemudian didiamkan selama 15 menit.

3.4.5.2 Proses Perkecambahan dan Kombinasi Perkecambahan serta Elisitasi

Proses perkecambahan kacang tanah dengan elisitasi jamur diadopsi dari penelitian yang dilakukan oleh Feng et al., (2007) dan Aisyah et al., (2015). Perkecambahan kacang tanah dilakukan dengan tiga perlakuan yang berbeda diantaranya yaitu, 1) perkecambahan dalam kondisi gelap (*germinated*, G), kombinasi perkecambahan dan elisitasi dengan pengaplikasian jamur pada dua kondisi waktu yang berbeda: 2) langsung setelah *spiking*/perendaman (hari ke-1) (G0_F), dan 3) setelah satu hari perkecambahan (hari ke-2) (G1_F). Untuk melihat pengaruh dari perkecambahan serta kombinasi perkecambahan dan elisitasi yang diberikan maka diperlukan sampel kacang tanah yang tidak digerminasi

(*ungerminated*, UG) sebagai pembandingan atau kontrol seperti yang ditampilkan pada Tabel 3.1. Setiap perlakuan sampel yang berbeda dirangkum sebagai berikut

Tabel 3.1 Perbedaan perlakuan masing-masing sampel kacang tanah

Perlakuan	Tahapan					
	Sterilisasi (2 menit)	<i>Spiking</i> (24 jam)	Perkecambahan (3 hari)	Elisitasi jamur		
				Day 1	Day 2	Day 3
UG	√	√	-	-	-	-
G	√	√	√	-	-	-
G0_F	√	√	√	√	√	√
G1_F	√	√	√	-	√	√

Kacang tanah disterilisasi dengan cara direndam dalam larutan hipoklorit 1% sebagai konsentrasi larutan hasil optimasi dengan perbandingan 50 mL/10 g biji kacang yang diadopsi dari Aisyah et al., (2013). Setelah dilakukan sterilisasi, kemudian kacang dibilas sebanyak empat kali dengan aquades steril. Kacang tanah yang telah dibilas dikupas kulitnya kemudian dilakukan perendaman. *Spiking* kacang tanah dilakukan dengan cara merendam kacang tanah dengan larutan OTA 100 ppb dengan perbandingan volume perendaman 10 mL/10 g biji kacang. Perendaman dilakukan dalam keadaan gelap dengan bantuan *shaker* selama 24 jam dalam suhu ruang untuk membantu distribusi dan penyerapan toksin yang maksimal.

Inokulasi jamur terhadap kacang tanah diaplikasikan saat setelah *spiking* dilakukan (G0_F). Bubuk jamur *Rhizopus sp* sebanyak 1 gram disuspensikan ke dalam 15 mL air steril. Kacang diinokulasi dengan menambahkan suspensi kultur jamur dengan perbandingan 0,75 mL/10 g biji kacang (15 mL/200 g) dalam cawan petri dan dicampur merata (Feng et al., 2007). Sehingga, kacang tanah berada dalam kondisi dielisitasi jamur dari mulai awal perkecambahan. Kacang dikecambahkan selama 3 hari dalam kondisi inkubasi pada suhu 30°C dengan RH 55-85%. Kacang yang telah diinokulasi jamur diletakkan di atas *tray* perkecambahan yang telah dilapisi oleh *cheesecloth* steril (disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit). Selanjutnya, *tray* yang telah terisi kacang dimasukkan ke dalam alat perkecambahan (*germinator*). Kondisi percobaan lain, inokulasi jamur dilakukan setelah perkecambahan kacang selama 24 jam pada suhu 25°C dan RH

100%. Kemudian, inokulasi jamur dilakukan pada hari kedua perkecambahan dengan mengubah kondisi suhu dan kelembaban germinator menjadi 30°C dengan RH 55-85% dengan jumlah hari perkecambahan selama 3 hari.

Sampel kecambah kacang tanah dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 40°C. Kecambah kacang tanah yang sudah kering digiling menggunakan penghalus bumbu (*blender*). Sampel hasil penggilingan selanjutnya disaring dengan saringan 80 mesh. Hasil penyaringan disimpan dalam lemari pendingin untuk diekstraksi dan dilakukan analisis selanjutnya.

3.4.6 Ekstraksi Okratoksin A pada Kecambah Kacang Tanah

Ekstraksi OTA dalam sampel dilakukan berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Soleimany et al., (2012) dengan perbandingan pelarut yang dimodifikasi berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (X. Zhao *et al.*, 2021). Bubuk sampel kecambah kacang tanah sebanyak 1 gram sampel dalam tabung falcon 15 mL ditambahkan 2 mL pelarut ekstraksi berupa asetonitril/air/asam asetat (84:15:1). Kemudian, dilakukan distribusi pelarut dalam sampel dibantu dengan menggoyangkan campuran pada 200 rpm selama 60 menit. Campuran disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipipet dan dimasukkan dalam tabung falcon 15 mL sedangkan residu digunakan untuk ekstraksi kedua. Residu ditambahkan sejumlah pelarut yang sama dan dalam kondisi yang sama seperti ekstraksi pertama. Supernatan yang dihasilkan dari ekstraksi kedua digabungkan ke dalam tabung falcon berisi supernatan ekstraksi pertama. Gabungan supernatan tersebut divortex hingga homogen dan disentrifugasi kembali pada 3000 rpm 10 menit. Gabungan supernatan dipipet sebanyak 1,5 mL ke dalam tabung eppendorf dan dimasukkan ke dalam *microinsert* untuk injeksi. Setiap sampel dilakukan ekstraksi sebanyak dua kali pengulangan.

3.4.7. Analisis Senyawa Okratoksin A pada Ekstrak Kacang Tanah menggunakan UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS

3.4.7.1. Kondisi UHPLC

Ekstrak kacang dianalisis menggunakan instrumen UHPLC. Fase diam kolom Kinetex® 2,6 µm C18 (50 × 2,1 mm) digunakan untuk memisahkan OTA. Fase gerak A terdiri dari 0,1% asam format dalam dan 0,1% asam format dalam asetonitril sebagai fase gerak B. Kondisi elusi

gradien (Tabel 3.2) digunakan dengan dengan laju alir 400 $\mu\text{L}/\text{menit}$ serta volume injeksi sampel 5 μL dalam suhu kolom konstan 40°C.

Tabel 3.2 Kondisi UHPLC dengan sistem elusi gradien

Step No.	Waktu (menit)	A (%)	B (%)
1	0	70	30
2	3	5	95
3	4	5	95
4	4.01	70	30
5	6	70	30

3.4.7.2. Kondisi Spektrometer Massa

Spektrometer massa *triple quadrupole* Shimadzu LCMS-8045 (Shimadzu, Tokyo, Jepang) dilengkapi dengan sumber ESI dalam mode ionisasi positif. Kondisi dan parameter spektrometer massa yang diadopsi dari (Prakasham et al., 2023).

Tabel 3.3 Kondisi analisis spektrometer massa

<i>Heat block temperature</i>	300°C
<i>DL temperature</i>	300°C
<i>Interface temperature</i>	300°C
<i>Heating gas flow rate</i>	10 L/menit
<i>Nebulizing gas flow temperature</i>	2.7 L/menit

Analisis kualitatif dan kuantitatif OTA dilakukan dalam mode pemindaian MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). MRM melakukan pemindaian ion prekursor pada Q1 dan pemindaian salah satu atau lebih ion fragmen di Q3. MS1 dan MS2 ditetapkan pada m/z tertentu di mana transisi ion prekursor terpilih menjadi ion produk terpilih. Pada penelitian ini, parameter spektrometri massa senyawa OTA dengan ion prekursor (m/z) 404.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Transisi MRM dengan intensitas tertinggi digunakan untuk kuantifikasi 404.1 \rightarrow 238.85 (-24 eV) dan sebagai fragmen konfirmasi 404.01 \rightarrow 358 (-15 eV) dan 404.01 \rightarrow 221 (-39 eV). Senyawa turunan OTA diperoleh dalam mode akuisisi *Product Ion Scan* (PIS). MS1 ditetapkan pada m/z ion prekursor terpilih dan MS2 berada dalam mode pemindaian. Spektrum massa diperoleh pada rentang massa (m/z) 100-1000 dalam mode ion positif dan negatif.

3.4.7. Analisis Statistik

Konsentrasi OTA ditentukan melalui kurva kalibrasi digunakan kalibrasi eksternal dengan menganalisis luas area puncak pada empat konsentrasi titik kalibrasi diantaranya 0,015; 0,04; 0,09; 0,115 ppm serta blanko. Deret standar kurva kalibrasi dibuat dengan menambahkan sejumlah larutan standar OTA 50 ppm ke dalam asetonitril/air/asam asetat (84:15:1) masing masing untuk mencapai deret konsentrasi yang diinginkan. Larutan kemudian divorteks dan disonikasi selama 1 menit. Selanjutnya, dipipet ke dalam *microinsert* untuk dilakukan analisis melalui UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS. Persamaan regresi linear diperoleh melalui kurva kalibrasi yang dibuat dengan melakukan plot luas area puncak OTA terhadap konsentrasi OTA.

Persentase penurunan dan konsenstrasi OTA pada kacang tanah akibat perlakuan dianalisis dengan *univariate analysis*. Uji *Tukey* digunakan untuk membandingkan perbedaan yang signifikan antara persentase penurunan OTA akibat perlakuan perkecambahan serta kombinasi perkecambahan-elisitasi pada dua titik waktu dengan. Tingkat signifikansi ditetapkan sebesar 5% ($p < 0,05$) untuk semua analisis yang dilakukan. Analisis dilakukan dengan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences 26.0* (SPSS) (Freire *et al.*, 2020; Magnoli *et al.*, 2007).