

BAB V. METODOLOGI PENELITIAN

A. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: sampel produk makanan (jagung segar, jagung popcorn, tepung maizena, popcorn, cornflakes, snack popcorn dan marning), baku pembanding untuk fumonisin (FB1 dan FB2), kolom imunoafinitas (*FumoniTestTM Columns*) untuk isolasi fumonisin, kolom HPLC fase terbalik C18, NaCl, metanol grade HPLC, metanol p.a. 100%, kertas saring millipore 0.45 μ m, aluminium foil, asam fosfat 30 %, aquades, miliQ, Phospat Buffer Saline (PBS) 1X, 1X 0.1% Tween 20/ PBS Wash buffer, VICAM *Fluted Filter Paper* 24 cm, kertas saring microfibre 1,5 μ m, 11 cm, Standar kalibrasi untuk fluorometer, tisu (*Kim wipes*), *FumoniTestTM developer A fluorometer*, *FumoniTestTM developer A HPLC*, *FumoniTestTM developer B HPLC/Fluorometer*, Natrium dihidrofosfat, HVLP 0.45 μ m untuk aquades, HVLP 0.45 μ m untuk metanol, serta buffer pH 4.01 dan 7.00 untuk kalibrasi pH-meter.

2. Alat

Alat-alat dan instrumen yang digunakan antara lain: HPLC dengan detektor fluorosensi, fluorometer beserta printer, *position pump stand with air pump*, refrigerator, penyaring vakum, *degasser* Tipe Branson 3510, vortex, *Vicam blender and glass blender jar*, pH-meter, timbangan analitik, mikropipet, *glass syringe* 100 μ l, *glass syringe* 10 ml (reservoir tahap isolasi), botol untuk developer kit, kuvet kaca sekali pakai untuk fluorometer seri C-4, rak kuvet, pipet dan gelas beaker sekali pakai, dan alat-alat gelas lain.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

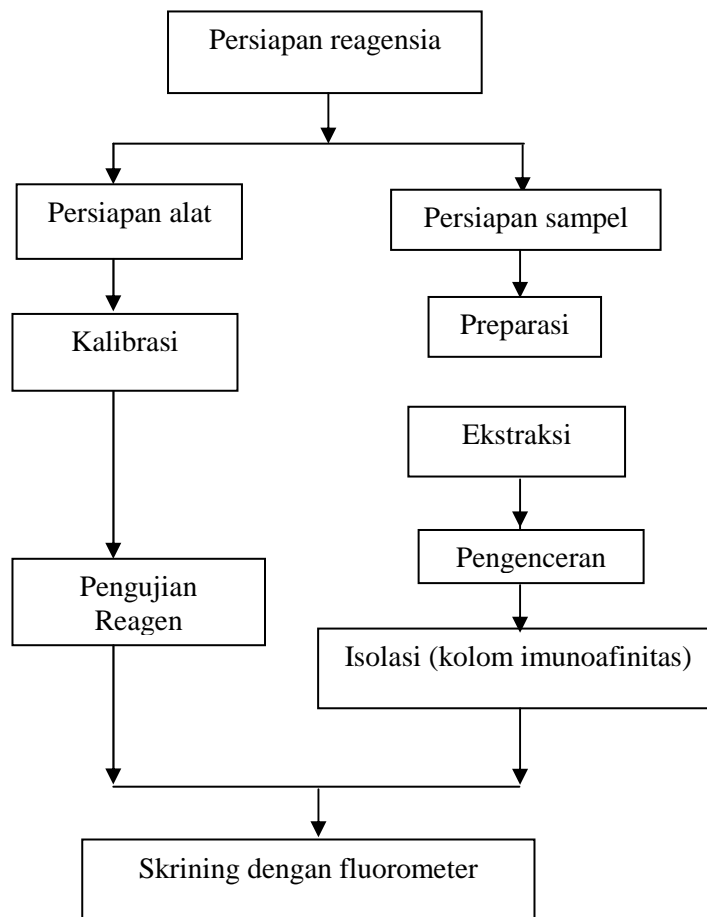
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

B. METODE PENELITIAN

Pengembangan metode deteksi fumonisin yang dilakukan pada kegiatan magang ini terbagi menjadi dua tahap, yaitu metode semikuantitatif untuk deteksi fumonisin total dan tahap awal metode kuantitatif fumonisin B1 dan B2 dengan HPLC. Metode semikuantitatif merupakan metode skrining untuk penentuan kadar fumonisin total sampel secara cepat. Metode ini menggunakan kolom imunoafinitas untuk proses isolasi fumonisin dan instrumen fluorometer untuk proses deteksi kadar fumonisin yang terderivatisasi. Pengembangan metode untuk deteksi fumonisin ini dilakukan dengan menggunakan prosedur *Vicam Manufacture* (Watertown, MA), yaitu FumoniTest fluorometer (Vicam, 2004). Tahapan kerjanya dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Skema metode deteksi fumonisin total dengan fluorometer.

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.

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

1. Metode semikuantitatif (skrining dengan fluorometer) (Vicam, 2004)

Pada tahap ini dilakukan ujicoba dan pengembangan metode deteksi fumonisin total dengan instrumen deteksi fluorometer. Tahapan prosedurnya adalah sebagai berikut:

a. Persiapan reagensia

1). Larutan ekstraksi

Larutan ekstraksi yang digunakan adalah metanol:air (80:20,v/v). Larutan dibuat dengan menuangkan metanol p.a. yang telah disaring dengan kertas saring HVLP 0.45 μm sebanyak 800 ml pada labu ukur 1000 ml. Kemudian ditambahkan miliQ sebanyak 200 ml hingga mencapai tanda tera. Larutan ini dapat digunakan selama tujuh hari pada suhu ruang.

2). Larutan 1 X PBS

Larutan 1 X PBS dibuat dengan pengenceran larutan PBS biang (10X PBS) yang dibeli dari *Vicam Company*. Pembuatannya yaitu larutan biang PBS dituang sebanyak 100 ml pada gelas atau labu ukur 1000 ml, kemudian ditambahkan dengan mili-Q sebanyak 900 ml dan dicampur hingga merata. Sebagai alternatif, larutan ini juga dapat dibuat dengan cara melarutkan 8.0 g NaCl, 1.2 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, dan 0.2 g KCL ke dalam 990 mL mili-Q, kemudian diatur pHnya hingga 7.0 dengan konsentrat HCL. Lalu ditepatkan lagi dengan mili-Q hingga 1000 ml. Larutan ini dapat bertahan hingga tujuh hari pada suhu ruang.

3). Larutan 1 X 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer

Larutan ini dibuat dengan cara mengencerkan larutan biang (10 X 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer) yang dibeli dari *Vicam Company*. 100 ml larutan biang 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer dituang dalam gelas atau labu ukur 1000 ml, kemudian ditambahkan dengan mili-Q 900 ml hingga mencapai tanda tera dan dicampur hingga merata. Sebagai alternatif, larutan ini juga dapat dibuat dengan pencampuran 1 ml larutan Tween-20 ke dalam 1000 ml

larutan 1X PBS. Larutan ini dapat bertahan hingga tujuh hari pada suhu ruang.

4). Mix Developer A dan B fluorometer

Reagen ini dibuat dengan cara developer B dipipet sebanyak 20 μ l, lalu dimasukkan ke dalam botol developer A (15 ml) yang spesifik untuk fluorometer. Campuran developer A dan developer B ini harus tertutup rapat sebelum digunakan dan hanya bertahan untuk dua hari pada suhu 4 $^{\circ}$ C.

b. Persiapan dan kalibrasi fluorometer

Instrumen fluorometer harus dikalibrasi minimal satu minggu sekali dengan standard khusus yaitu *FumoniTest Calibration Standard*, dengan masa pakai selama satu tahun. Kalibrasi dilakukan dengan memasukkan vial standar kalibrasi FumoniTest yang berwarna merah pada tempat sampel, lalu akan muncul nilai “6 ppm” pada display (atur bila belum sesuai). Kemudian vial merah dikeluarkan dan diganti dengan vial hijau. Setelah di enter, selanjutnya pada display akan muncul nilai “-0.5 ppm” (atur bila belum sesuai). Setelah vial biru dikeluarkan, instrumen disetting untuk pembacaan sampel (*delay time setting* : 4 menit) dan vial standar kalibrasi kuning dimasukkan. Instrumen dikatakan masih baik bila nilai yang ditunjukkan pada display sebesar “2.8 \pm 0.3 ppm”. Setelah vial kuning dikeluarkan, display akan menunjukkan “VICAM VX.X READY” dan fluorometer siap digunakan.

c. Pengujian reagen

Pengukuran fumonisin didasarkan pada pembentukan derivat fluorosensi. Oleh karena itu penting untuk memastikan tidak ada latar fluoresens pada reagen pereaksi dan kuvet yang digunakan agar hasil pengukuran fumonisin akurat. Pengujian reagen ini dilakukan dengan memipet 1.0 ml metanol grade HPLC untuk elusi kolom ke dalam kuvet. Lalu ditambahkan 1.0 ml campuran developer A dan B ke dalam kuvet dan dicampur merata. Kuvet yang digunakan untuk pengujian fluorometer ini hanya dapat sekali pakai. Kemudian ukur

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.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

nilai fluoresensinya. Hasil pembacaan ini harus menunjukkan nilai “0” atau minus. Hal yang sama harus dilakukan pada reagen-reagen lain, yaitu metanol:air (80:20, v/v), PBS, dan 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer, dengan memasukkannya pada kuvet masing-masing sebanyak 2 ml.

d. Preparasi sampel

Prosedur FumoniTest fluorometer ini telah dioptimasi untuk beberapa sampel, yaitu jagung, sorgum, dan pakan ternak dengan kadar protein 17 %. Namun, pada penelitian ini dilakukan uji coba pengujian pada jagung segar, jagung popcorn, popcorn, cornflakes, tepung maizena, snack popcorn dan produk jagung goreng (maring) yang diperoleh dari pasar lokal setempat. Hal ini didasarkan pada penelitian mengenai keberadaan fumonisin dalam produk-produk berbasis jagung yang dilakukan oleh Castelo *et al.* (1998), di mana hasilnya mengindikasikan bahwa terdapat risiko paparan manusia terhadap fumonisin melalui konsumsi beberapa produk pangan berbasis jagung.

e. Ekstraksi sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara menyiapkan blender kaca yang bersih. Kemudian sampel ditimbang sebanyak 50 g dan dimasukkan ke dalam blender jar, selanjutnya ditambah 5 g NaCl dan 100 ml metanol:air (80:20,v/v). Setelah itu blender ditutup dan dinyalakan dengan kecepatan tinggi (*High*) selama satu menit. Setelah satu menit, blender dibuka dan ekstrak dituang di atas kertas saring (*fluted filter paper*) yang di bawahnya diletakkan gelas beaker plastik sekali pakai sebagai penampung filtrat. Setelah diperoleh 10 ml filtrat, dilanjutkan dengan tahap pengenceran.

f. Pengenceran sampel

Pengenceran sampel dilakukan setelah diperoleh ekstrak sebanyak 10 ml, ekstrak dimasukkan ke dalam tabung yang bersih, lalu diencerkan dengan penambahan 40 ml 0.1 % Tween-20/PBS wash

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.

2. Dilarang memungut dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

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.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

buffer dan campur hingga merata. Setelah itu filtrat disaring kembali dengan 0.1 μm *microfibre filter* yang diletakkan di atas tabung bersih atau langsung pada syringe gelas ukur hingga 10 ml (gunakan kertas saring baru untuk setiap filtrasi).

g. Isolasi fumonisin

Syringe gelas ukur yang menampung 10 ml filtrat di bagian bawahnya dipasang *FumoniTestTM affinity column*. Lalu filtrat dilewatkan pada kolom tersebut pada laju 1-2 tetes/detik hingga udara keluar melalui kolom. Jika aliran berhenti atau terlalu lama dapat dibantu dengan pompa udara. Selanjutnya disiapkan 10 ml 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer dan dilewatkan pada kolom dengan kecepatan 1-2 tetes/detik. Proses ini dilanjutkan dengan melewati 10 ml PBS melalui kolom imunoafinitas dengan laju 1-2 tetes/detik hingga terdapat udara keluar kolom. Langkah selanjutnya yaitu kuvet gelas khusus fluorometer diletakkan di bawah *FumoniTestTM affinity column* dan proses elusi dilakukan, di mana 1 ml metanol grade HPLC ditambahkan ke dalam syringe gelas ukur. Setelah dilewatkan pada kolom dengan kecepatan 1-2 tetes/detik, 1 ml eluat sampel ditampung dalam kuvet gelas.

h. Deteksi dengan fluorometer

Pengukuran fluoresensi dilakukan dengan menambahkan 1 ml campuran developer A dan B ke dalam kuvet berisi eluen, usahakan agar terjadi pencampuran yang merata. Alat fluorometer diset dan kuvet gelas diletakkan dalam fluorometer yang telah terkalibrasi. Emisi fluoresens akan terbaca setelah 4 menit.

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.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

2. Kajian validasi metode FumoniTest fluorometer

Dalam suatu pengembangan metode, perlu adanya validasi metode analisis untuk mengetahui performa metode yang digunakan. Data-data uji validasi metode FumoniTest Fluorometer berupa data sekunder yang telah disediakan oleh produsen Vicam. Karena kesamaan seluruh prosedur dan peralatan yang digunakan, maka tidak dilakukan pengujian ulang. Hasil validasi metode ini akan diolah secara statistik untuk penentuan nilai-nilai parameter validasi. Beberapa parameter data uji validasi metode FumoniTest fluorometer pada sampel jagung adalah sebagai berikut :

a. Linieritas

Sesuai dengan ISO 17025:2005, linieritas didefinisikan sebagai kemampuan dari metode untuk mendapatkan hasil yang proporsional terhadap rentang konsentrasi tertentu. Data linieritas ini diperoleh dengan menguji konsentrasi fumonisin total pada sampel jagung hasil *spike* pada kisaran konsentrasi 0.25 hingga 10 ppm (0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 dan 10 ppm), masing-masing 12 ulangan. Sampel-sampel ini diuji konsentrasi fumonisin totalnya sesuai dengan tahapan metode FumoniTest fluorometer. Selanjutnya dibuat kurva regresi linier pada data yang diperoleh. Informasi linieritas ini dapat dilihat dari hasil *slope* dan persamaan regresi yang diperoleh.

b. Akurasi

Akurasi adalah kebenaran pengukuran kadar dari metode analisis atau kedekatan antara nilai kadar perhitungan dengan nilai kadar sesungguhnya. Menurut petunjuk Protokol Validasi FumoniTest Vicam, Akurasi dihitung sebagai persentase perbandingan antara hasil uji yang diperoleh dengan konsentrasi *spike*. Data untuk akurasi ini diperoleh dari tujuh level konsentrasi fumonisin yang berbeda, yaitu 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 dan 10 ppm pada sampel jagung hasil *spike*. Sampel-sampel ini diuji konsentrasi fumonisin totalnya sesuai dengan tahapan metode FumoniTest fluorometer.

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.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

c. Presisi

Presisi dari prosedur analisis diekspresikan dari simpangan baku, rata-rata, dan simpangan baku relatif (RSD) dari satu seri pengukuran (Arifin *et al.*, 2006). Data presisi ini diperoleh dengan menguji tujuh konsentrasi fumonisin berbeda pada sampel hasil *spike*, yaitu 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 dan 10 ppm, dengan masing-masing 12 ulangan.

d. Limit deteksi

Uji ini dilakukan dengan mengukur fumonisin total pada sampel hasil *spike* dengan konsentrasi paling rendah yang dapat terdeteksi absorbansinya (Arifin *et al.*, 2006), kemudian konsentrasi terdeteksi itu diulang hingga 12 kali. Pada uji ini, limit deteksi ditentukan dari jumlah konsentrasi fumonisin terkecil yang terdeteksi secara akurat dan presisi. Tiga konsentrasi terendah yang diuji yaitu 0.1, 0.25, dan 0.5 ppm. Setelah diperoleh hasil pengukuran, ditentukan nilai rata-rata, simpangan baku, dan simpangan baku relatifnya. Jika ketiga nilai ini cukup baik, maka konsentrasi uji dinyatakan sebagai limit deteksi.

3. Tahap awal metode kuantitatif (FumoniTest HPLC)

a. Pengkondisian instrumen

Tahapan ini berfungsi untuk mengoptimalkan kondisi instrumen agar memberikan hasil akurat pada proses pengujian. Beberapa parameter pada instrumen harus diatur sesuai dengan metode FumoniTest fumonisin yang digunakan, parameternya adalah sebagai berikut:

HPLC 20 AD Shimadzu Set Up

Kolom : Shim-pack CLC(M), RF, 4.6 mm ID x 25 cm, 5 μ m

Fase gerak: Metanol:0.1 M NaH₂PO₄ (77:23,v/v), pH 3.3 (asam fosfat)

Detektor : Fluorescence, eksitasi 335 nm, emisi 440 nm

Laju alir : 0.8 mL/menit

Suhu kolom: 40 °C

Selain menyesuaikan parameter instrumen dengan parameter metode pengujian, dilakukan pula proses pembilasan kolom dengan larutan-larutan pembilas pada tekanan yang meningkat (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, dan 1 ml/mnt). Bila garis dasar (*baseline*) yang ditampilkan sudah baik dan tekanan kolom telah mencapai kisaran normal, maka dapat dilakukan ujicoba pengaliran fase gerak uji fumonisin, yaitu metanol : 0.1 M NaH_2PO_4 (77:23, v/v) dengan pengaturan pH hingga 3.3 dengan asam fosfat. Fase gerak dibuat untuk pengaliran isokratik, yaitu pencampuran metanol dan 0.1 M NaH_2PO_4 dengan perbandingan 77:23 diluar sistem HPLC. Fase gerak yang telah disaring dan bebas gelembung, dialirkan pada kolom HPLC dengan laju alir 0.2 ml/menit, setelah garis dasar stabil dan tekanan cukup baik, aliran dinaikkan secara bertahap hingga 0.8 ml/menit.

Sistem deteksi yang digunakan adalah detektor fluoresens Shimadzu dengan panjang gelombang eksitasi 335 nm dan emisi 440 nm. Tahapan lengkap pengkondisian instrumen HPLC dapat dilihat pada **Lampiran 3**. Jika tekanan kolom HPLC masih relatif rendah dan garis dasar tetap stabil, HPLC telah siap untuk penginjeksian. Beberapa tahapan yang harus dilakukan pada proses pengkondisian instrumen HPLC ini antara lain:

- 1). Pembuatan larutan pembilas
 - a). Larutan metanol 100 % saring

Larutan pembilas ini dibuat dengan cara menyiapkan botol sampel bersih berukuran 500 ml. Metanol p.a. sebanyak 500 ml (sesuai kebutuhan) dituangkan pada labu erlenmeyer atau gelas beaker. Setelah itu metanol disaring dengan kertas saring HVLP yang diletakkan di antara *vacuum manifold* yang terhubung dengan labu penampung. Setelah tersaring, metanol dituang ke dalam botol bersih dan ditutup dengan aluminium foil/parafilm. Kemudian larutan metanol ini dihilangkan gasnya (*degassing*) selama 15-30 menit (tergantung banyaknya gelembung udara) dan larutan pembilas siap digunakan. Proses

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.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



penyaringan dan penghilangan gelembung ini harus dilakukan setiap hari sebelum proses pembilasan kolom dilakukan.

b). Larutan aquades saring

Larutan ini dibuat dengan cara menyiapkan botol sampel bersih berukuran 500 ml. Aquades sebanyak 500 ml (sesuai kebutuhan) dituangkan pada labu erlenmeyer atau gelas beaker. Setelah itu aquades disaring dengan kertas saring HVLP yang diletakkan di antara *vacuum manifold* yang terhubung dengan labu penampung. Setelah tersaring, aquades dituang ke dalam botol bersih dan dihilangkan gasnya selama 15-30 menit (tergantung banyaknya gelembung udara) dan larutan pembilas ini siap digunakan. Proses penyaringan dan penghilangan gelembung ini harus dilakukan setiap hari sebelum proses pembilasan kolom dilakukan.

c). Pembuatan fase gerak uji fumonisin

Labu ukur 100 ml yang bersih dan kering disiapkan. Lalu NaH_2PO_4 dalam bentuk kristal sebanyak 1.38 g dimasukkan ke dalam labu ukur. Tepatkan dengan mili-Q hingga tanda tera dan dikocok hingga larut. Kemudian larutan sebanyak 23 ml dipindahkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan dengan 77 ml metanol hingga tepat 100 ml. Aduk merata dengan *magnetic stirrer* pada *hotplate*. Selanjutnya bufer disiapkan untuk kalibrasi pH-meter (4.01 dan 7.00). Kemudian larutan yang telah dibuat diuji pHnya dengan pH-meter yang telah terkalibrasi dan ditepatkan pHnya hingga 3.3 dengan asam fosfat 30 %. Saring larutan dengan kertas saring HVLP dalam penyaring vakum dan rendam dalam *degasser* selama 15-30 menit (tergantung banyaknya gelembung) dan fase gerak siap digunakan. Fase gerak ini harus selalu segar (dibuat tiap hari pengujian).

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.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

2). Penyesuaian parameter instrumen HPLC

Kondisi instrumen HPLC menurut instruksi manufaktur Vicam yaitu kolom fase terbalik C18 (*Waters Nova-Pak®C18*, 3.9 mm x 150 mm, 4 µm. Fase gerak yang digunakan adalah metanol: 0.1 M NaH₂PO₄ (77:23,v/v), pH diatur hingga 3.3 dengan asam fosfat. Kecepatan aliran 0.8 ml/min. Suhu kolom 40 °C. Serta penggunaan detektor fluoresens (*Waters 474 scanning fluorescence detector*), eksitasi 335 nm dan emisi 440 nm.

b. Optimasi fase gerak

Perbedaan merk instrumen dan jenis kolom HPLC yang diinstruksikan oleh produsen *Vicam* dengan yang digunakan di laboratorium PROM, mengharuskan dilakukannya optimasi komposisi fase gerak yang digunakan. Optimasi fase gerak ini bertujuan untuk memperoleh peak kromatogram yang baik, dalam hal efisiensi separasi peak yang terbentuk, respon fluoresens, dan keberadaan pengotor (*noise*) pada kromatogram. Optimasi fase gerak ini dilakukan dengan melakukan ujicoba penyuntikan fumonisin baku dengan beberapa kondisi dan komposisi fase gerak yang berbeda. Beberapa proses yang harus dilakukan pada tahapan ini antara lain :

1). Pembuatan larutan developer HPLC

Larutan developer yang digunakan untuk uji konfirmasi HPLC merupakan larutan campuran developer A dan developer B khusus HPLC. Cara pembuatan reagen ini yaitu developer B dipipet sebanyak 10 µl, lalu dimasukkan ke dalam botol developer B (5 ml) yang spesifik untuk HPLC. Penggunaan rasio pencampuran antara developer A dan developer B yang berbeda pada metode HPLC dan metode fluorometer mengakibatkan perbedaan waktu delay yang digunakan pada kedua metode. Campuran developer A dan developer B ini digunakan untuk menderivatisasi sampel, yaitu ditambahkan pada sampel dengan perbandingan 1:9 sebelum diinjeksi ke dalam sistem HPLC.

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.

2. Dilarang memungut dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Reagen ini harus tertutup rapat sebelum digunakan dan hanya bertahan untuk lima hari pada suhu 4 °C.

2). Persiapan baku uji fumonisin

Untuk melakukan optimasi fase gerak, perlu dilakukan ujicoba penginjeksian fumonisin baku untuk mengetahui efisiensi separasi peak, respon fluoresens, dan keberadaan *noise* pada kromatogram yang dihasilkan. Fumonisin baku yang digunakan berasal dari larutan baku biang fumonisin dengan konsentrasi 1000 ppb. Dari larutan tersebut kemudian dilakukan pengenceran dengan larutan metanol grade HPLC hingga diperoleh beberapa larutan kerja dengan konsentrasi yang lebih rendah (750, 500, 100, 50, dan 25 ppb). Pemilihan konsentrasi kerja ini sebaiknya berada di atas limit deteksi metode HPLC yang digunakan, yaitu 16 ppb.

c. Kajian perbedaan tahapan FumoniTest fluorometer dan FumoniTest HPLC

Metode FumoniTest fluorometer bersifat semikuantitatif dan berfungsi sebagai metode skrining fumonisin, sedangkan metode FumoniTest HPLC lebih bersifat kuantitatif. Namun kedua metode ini menggunakan prinsip yang relatif sama, terutama penggunaan kolom imunoafinitas sebagai tahap isolasi fumonisin dan proses deteksinya berdasarkan kemampuan emisi fluoresens. Namun terdapat beberapa perbedaan tahapan kedua metode ini, sehingga dilakukan pembuatan tabel perbandingan antara keduanya. Metode FumoniTest HPLC dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 4**.

d. Korelasi uji FumoniTest fluorometer dan FumoniTest HPLC

Korelasi hasil pengujian antara kedua metode ini merupakan data sekunder yang penting untuk mengetahui kesesuaian dan kecocokan antara kedua metode. Data-data ini diperoleh dengan mengambil data dari pengujian 33 sampel jagung, yaitu 17 sampel terkontaminasi alami dan 16 sampel dari dua jenis jagung hasil *spike* pada delapan konsentrasi yang berbeda (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0,

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.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



7.5, dan 10 ppm). Hasil yang diperoleh dibuat kurva korelasinya dan dilakukan analisis tingkat korelasinya dengan regresi linier.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural 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.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.