

BAB VI. PENGEMBANGAN METODE

Pengembangan metode adalah suatu tahapan proses untuk menemukan atau memperbaiki metode analisis suatu analit agar sesuai dengan kebutuhan. Tahap ini umumnya dilakukan bila belum tersedianya metode analisis yang sesuai untuk analit tertentu dalam matriks sampel yang khusus.

Pusat Riset Obat dan Makanan secara bertahap melakukan pengujian pada metode-metode standar internasional untuk diuji kesesuaiannya dengan laboratorium intern dan sampel-sampel pangan dalam negeri. Hasil pengembangan metode yang telah tervalidasi nantinya diharapkan akan berguna untuk Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN) Badan POM dan balai-balai pengujian di Indonesia untuk mendukung tugas-tugasnya dalam melakukan pengawasan terhadap keamanan pangan di Indonesia.

A. TAHAPAN METODE VICAM FUMONITEST FLUOROMETER

Metode ini merupakan tahap awal deteksi fumonisin pada pangan. Penggunaan metode ini bertujuan untuk skrining awal pengujian yang bermanfaat untuk menentukan konsentrasi larutan standar baku yang akan digunakan pada pembuatan kurva standar pada metode kuantitatif dengan HPLC. Tahap ini penting dilakukan agar diperoleh kisaran garis linear kurva standar yang ideal untuk berbagai respon dari sampel-sampel yang diuji, menghindari pemborosan waktu serta baku dan reagen-reagen pengujian yang relatif mahal. Selain itu, tidak semua pengujian memerlukan kuantitasi yang akurat. Hasil uji kualitatif ataupun semikuantitatif terkadang sudah cukup memenuhi kebutuhan yang diinginkan. Pembahasan secara detil tahapan pengujian skrining awal dengan fluorometer ini antara lain :

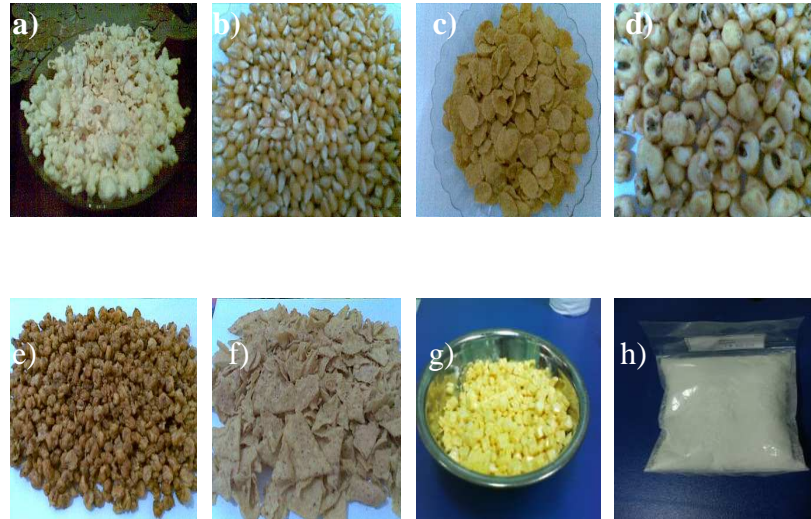
1. Preparasi sampel

Sampel-sampel yang diperoleh dari pasar lokal setempat, yaitu jagung segar, jagung popcorn, popcorn, tortilla, cornflakes, snack popcorn, tepung maizena dan marning (**Gambar 3**) masing-masing digiling kasar dengan *crusher* merk Hamada Hi Poumix HP-380 (kecuali tepung maizena) untuk mempermudah proses penimbangan dan meningkatkan

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.

homogenisitas. Bila tidak langsung diuji, sampel giling ini disimpan di tempat yang kering dan dingin untuk mencegah perubahan kandungan fumonisin.



Gambar 3. Beberapa sampel uji fluorometer: a) Popcorn; b) Jagung popcorn; c) Corn flakes; d) Snack jagung; e) Marning; f) Tortilla; g) Jagung segar; h) Tepung jagung.

2. Ekstraksi sampel

Pada tahapan ini komponen analit dipisahkan dari komponen-komponen sampel yang lain dengan cara melarutkannya pada pelarut yang sesuai (Nielsen, 2003). Tahap ini melibatkan pencampuran sampel dengan solven yang dilanjutkan dengan proses filtrasi. Peralatan-peralatan dan larutan yang digunakan harus bersih dan bebas dari senyawa berfluoresens karena akan kontak langsung dengan sampel. Penambahan 5 g NaCl ke dalam 50 g sampel berfungsi sebagai garam fisiologis, yaitu garam organik untuk menjaga salinitas dan kondisi fisiologi jaringan sampel.

Pada metode ini pelarut ekstrak yang digunakan adalah metanol:air (80/20, v/v), di mana penggunaan pelarut organik yang dikombinasikan dengan pelarut polar (air) dapat melepaskan ikatan elektrostatis lemah antara fumonisin dengan makromolekul. Proses pencampuran dilakukan pada blender kaca *Waring commercial Vicam*. Hanya blender dengan bahan *stainless steel* atau kaca yang dapat digunakan, kontak reagen-reagen dan larutan uji (seperti metanol, pelarut elusi, ekstrak, atau

developer) dengan karet atau plastik elastis akan melepaskan sinar fluoresens ke dalam sampel yang diuji dan menyebabkan terjadinya kesalahan positif.

Proses blending dilakukan selama satu menit dengan kecepatan tinggi (*high*). Waktu ekstraksi umumnya diperoleh dengan memplot waktu transfer analit secara kuantitatif ke dalam pelarut hingga diperoleh waktu ideal. Berdasarkan penelitian Pastorini (2005), waktu ekstraksi harus dilakukan sesuai prosedur, proses ekstraksi yang terlalu lama tidak akan meningkatkan jumlah fumonisin yang terekstrak, namun jumlahnya justru menurun akibat panas dari alat blender yang digunakan.

Namun pada kenyataannya, proses blending ekstrak dengan kecepatan *high* selama 1 menit tidak baik dilakukan. Hal ini karena timbulnya asap dan aroma gosong ketika blender dibuka. Oleh karena itu dilakukan modifikasi berupa perubahan kecepatan blending sampel, dari *high* menjadi *medium*. Hasil ekstraksi dengan kecepatan *medium* juga memberikan hasil yang cukup baik, yaitu tingkat kehalusan dan homogenitasnya relatif sama.

Langkah filtrasi yang pertama adalah filtrasi gravitasi melalui *fluted filter paper* yang bertujuan untuk memisahkan larutan ekstrak sampel dari partikel-partikel solid yang kasar. Filtrat ditampung di wadah yang bersih hingga mencapai jumlah yang dibutuhkan (10 ml) untuk tahap selanjutnya (isolasi). Pada tahap ini dilakukan modifikasi, di mana proses filtrasi dilakukan hingga seluruh larutan terekstrak, yang kemudian filtrat dihomogenkan dan diambil 10 ml untuk tahap selanjutnya sehingga hasil yang diperoleh lebih representatif.

3. Pengenceran sampel

Pengenceran sampel dilakukan untuk meminimalisir terjadinya denaturasi antibodi fumonisin dari larutan ekstraksi yang mengandung metanol, selain itu hal ini juga merupakan strategi untuk menyasati kapasitas kolom yang terbatas. Larutan pengencer yang digunakan adalah 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer sebanyak 40 ml. Tween 20 (Polysorbate 20) merupakan agen pembilas pada pengujian *immunoassay*, emulsifier ini

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 mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

sangat stabil dan dapat mencegah pengikatan antibodi yang non-spesifik. Dalam penggunaannya sebagai pengencer atau pembilas dalam *immunoassay*, umumnya Tween 20 dilarutkan dalam PBS pada pengenceran 0.05 % hingga 0.5 % (v/v).

Filtrat encer yang telah homogen difiltrasi kembali dengan *microfibre filter*. Hal ini dilakukan untuk mencegah terikutnya endapan ekstrak, sehingga ekstrak akan mudah dilewatkan pada kolom imunoafinitas pada tahap isolasi. Proses filtrasi dilakukan langsung pada syringe gelas ukur 10 ml yang pada bagian bawahnya dipasang kolom FumoniTest.

4. Isolasi sampel

Pada tahap isolasi ini ekstrak kasar yang diperoleh dimurnikan dengan cara membuang komponen-komponen lain yang dapat mengganggu pada tahap deteksi fluorometer. Tahap ini menggunakan kolom imunoafinitas FumoniTestTM (**Gambar 4**), yang mengandung antibodi spesifik yang dapat mengisolasi fumonisin dari matriks pangan. Pada bagian atas kolom ini dipasang tabung gelas penampung ekstrak (reservoir merk Clover Tek) 10 ml, yang dapat dilalui udara untuk membantu menstabilkan kecepatan aliran di dalam kolom.



Gambar 4. Kolom imunoafinitas FumoniTest dan pengujiannya pada tahap isolasi

Kolom imunoafinitas ini menggunakan antibodi fumonisin yang berikatan secara kovalen dengan matriks gel pada *cartridge*. Ketika ekstrak sampel dilewatkan, fumonisin akan berikatan dengan antibodi pada kolom. Ekstrak dilewatkan pada kecepatan 1-2 tetes/detik hingga udara

keluar melalui kolom. Adanya udara yang keluar melalui kolom mengindikasikan bahwa seluruh ekstrak sudah dilewatkan pada kolom. Untuk mengeluarkan komponen-komponen koekstraksi lain, dilakukan pembilasan pada kolom, yaitu dengan 10 ml 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer pada kecepatan 1-2 tetes/detik yang dilanjutkan dengan 10 ml PBS melalui kolom dengan laju 1-2 tetes/detik hingga kolom mengeluarkan udara.

Pada tahap ini, kolom imunoafinitas dihubungkan dengan pompa udara yang dapat dibuka tutup secara manual. Jika aliran berhenti atau terlalu lama, dapat dibantu secara manual dengan pompa, yaitu menekan cairan pada kolom dengan pengaliran udara. Laju tetesan merupakan hal yang kritis pada tahap ini, perbedaan laju tetes diduga memberikan hasil respon yang berbeda pada proses deteksi. Kecepatan aliran ekstrak maupun larutan pembilas akan mempengaruhi aktivitas antibodi sehingga akan mempengaruhi kemampuan kolom dan persentase *recovery* toksin dari sampel.

Fumonisin murni diperoleh dengan cara elusi dengan pelarut metanol grade HPLC sebanyak 1 ml. Pelarut elusi ini akan mendenaturasi antibodi di dalam kolom sehingga ikatan fumonisin akan lepas. Dengan prinsip ini, metode imunoafinitas dapat berguna untuk diaplikasikan pada semua matriks pangan. Beberapa produk pangan dengan kadar lemak atau kandungan garam tinggi (mis: cornflakes), yang tidak dapat diisolasi dengan SAX, juga memberikan hasil yang lebih baik dengan isolasi imunoafinitas.

5. Derivatisasi sampel

Fumonisin tidak berfluoresens dan tidak mengandung khromofor yang menyerap UV, sehingga harus dilakukan proses derivatisasi untuk memungkinkan proses deteksi dengan fluorometer. Tahap derivatisasi dilakukan dengan pencampuran 1 ml fumonisin hasil elusi dengan 1 ml campuran developer yang telah disiapkan sebelumnya. Campuran developer A dan developer B ini merupakan reagen fluoresens, namun komposisi pastinya tidak diketahui karena merupakan rahasia perusahaan

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. 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.

Vicam. Reagen fluoresens ini akan bereaksi dengan grup amino bebas pada fumonisin. Sebagai hasil, yaitu analit termodifikasi akan mengemisikan sinar fluoresens yang jumlahnya proporsional dengan kandungan analit (fumonisin) pada sampel.

6. Deteksi fluorometer

Deteksi dengan fluorometer (**Gambar 6**) didasarkan pada intensitas sinar fluoresens yang terpancar pada sampel. Prinsip analisisnya yaitu penggunaan sinar UV yang mengeksitasi elektron pada molekul analit dan menyebabkan molekul tersebut beremisi dengan panjang gelombang tertentu. Oleh karena itu hasil yang diperoleh pada pengukuran ini merupakan jumlah fumonisin total. Hasil ini bermanfaat untuk estimasi toksin di dalam sampel, sehingga penentuan kisaran kurva standar dalam uji kuantitatif akan tepat dan akan meningkatkan efisiensi waktu dan biaya.



Gambar 5. Instrument Fluorometer Series-4Ex.

B. KAJIAN VALIDASI METODE FUMONITEST FLUOROMETER

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Beberapa parameter utama yang akan dibahas untuk menentukan performa metode FumoniTest fluorometer ini antara lain:

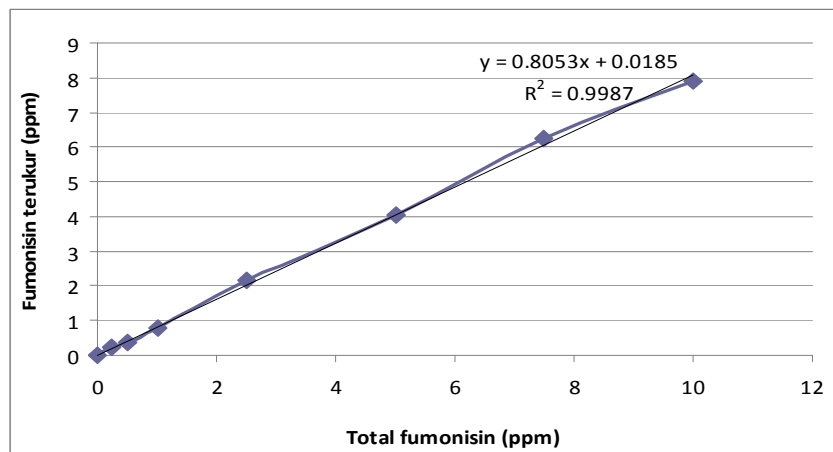
1. Linieritas

Persyaratan data linieritas untuk validasi metode bisa diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) lebih besar atau sama dengan 0.999.

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.

Hubungan antara konsentrasi total fumonisin sampel hasil spike dengan sinyal absorbansi memperoleh persamaan linearitas kurva standar, yaitu $y=0.8053x + 0.0185$, dengan nilai r sebesar 0.999. Hal ini menunjukkan bahwa metode FumoniTest fluorometer ini memberikan hasil/respon yang baik terhadap konsentrasi analit yang diberikan. Data dan perhitungan parameter linieritas dapat dilihat pada **Lampiran 8** dan kurva linieritasnya adalah sebagai berikut (**Gambar 6**).



Gambar 6. Kurva parameter linieritas metode FumoniTest fluorometer.

2. Akurasi

Hasil pengujian akurasi metode yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata persentase akurasi cukup baik, yaitu 82 % untuk kisaran analit 0.25 hingga 10 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa pada kisaran analit 0.25 hingga 10 ppm, nilai kadar perhitungan yang diperoleh dengan nilai kadar sesungguhnya relatif dekat. Data dan perhitungan parameter akurasi dapat dilihat pada **Lampiran 9**.

3. Presisi

Presisi adalah derajat kedekatan antara hasil pengukuran dari metode analisis yang digunakan atau derajat keterulangan dari hasil pengukuran metode analisis. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0.25 dan 0.5 ppm, presisi yang diperoleh kurang baik yaitu mencapai lebih dari 25 %. Sedangkan pada konsentrasi di atas 1.0 ppm hingga 10 ppm, presisi yang diperoleh <13 %. Sehingga nilai presisi (sensitivitas) metode FumoniTest fluorometer ini adalah < 13 % pada

kisaran konsentrasi sampel 1-10 ppm. Data presisi dan perhitungan lengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

4. Limit deteksi

Limit deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil dari analit yang dapat dideteksi (tanpa harus terkuantifikasi) secara cermat dan seksama. Dari tiga konsentrasi yang diuji (0.1, 0.25, dan 0.5 ppm), hanya 0.25 dan 0.5 ppm yang memberikan nilai RSD yang baik (< 25 %); sedangkan pada konsentrasi 0.1 ppm, nilai RSDnya sangat tinggi, yaitu 154, 93 %; sehingga dapat disimpulkan bahwa limit deteksi metode FumoniTest ini adalah 0.25 ppm. Data dan perhitungan lengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 11**.

OPTIMASI PENGUJIAN METODE FUMONITEST FLUOROMETER

Pengujian pertama dilakukan pada sampel jagung popcorn dan produk jagung goreng dengan langkah-langkah prosedur sesuai dengan metode FumoniTest, pada Manual Instruksi Vicam. Hasil pengukuran fumonisin pada sampel-sampel ini dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Data hasil pengujian Fluorometer tahap 1.

No	Nama sampel	Ulangan (ppm)			Rata-rata (ppm)	SD	% RSD
		1	2	3			
1	Jagung popcorn 1	0.54	0.59	<0.25	0.453	0.18	39.7
2	Jagung popcorn 2	0.45	0.82	0.88	0.717	0.23	32.1
3	Jagung popcorn 3	0.26	0.27	0.64	0.390	0.22	56.4
4	Marning 1	0.42	<0.25	1.40	0.616	0.63	102.3
5	Marning 2	3.70	1.80	0.81	2.103	1.47	70.0

Dari hasil yang diperoleh, terlihat bahwa kandungan fumonisin pada sampel jagung popcorn 1, 2, dan 3 (sumber batch yang sama) berbeda cukup jauh yaitu 0.453, 0.717, dan 0.390 ppm. Pengujian pada sampel marning, yaitu marning 1 dan marning 2 (sumber batch sama) juga menunjukkan hasil yang sangat berbeda yaitu 0.616 dan 2.103 ppm.

Selain itu, nilai ulangan dari masing-masing pengujian menunjukkan nilai presisi yang sangat buruk. Nilai RSD yang diperoleh pada tiap uji

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 mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



mencapai lebih dari 30 %, bahkan ada yang mencapai 100 %. Melihat hasil validasi metode pengujian, presisi yang memuaskan memang sulit diperoleh. Hal ini akibat penggunaan kolom imunoafinitas pada tahap isolasi. Kapasitas kolom ini sangat terbatas, sehingga nilai presisi pada hasil akhir juga dipengaruhi oleh kemampuan *recovery* tiap-tiap kolom. Namun nilai RSD hasil uji ini masih terlalu tinggi bila dibandingkan dengan nilai RSD validasi, yaitu < 13 %, sehingga harus dilakukan beberapa optimasi untuk memperbaiki nilai presisinya.

Beberapa faktor penting yang harus dioptimasi karena mempengaruhi aktivitas antibodi pada kolom, antara lain kekuatan pelarut, kecepatan aliran, dan volume ekstrak yang diaplikasikan pada kolom. Namun kekuatan pelarut dan volume ekstrak yang diaplikasikan pada kolom relatif sama pada tiap ulangan uji, sehingga tidak akan mempengaruhi buruknya presisi hasil yang diperoleh. Oleh karena itu hal ini diduga akibat faktor kritis tahap isolasi, yaitu kecepatan aliran atau penetesannya yang kurang seragam yang diduga mempengaruhi hasil, terutama pada proses pengikatan dan elusi fumonisin.

Selanjutnya dilakukan pengujian ulang terhadap sampel jagung popcorn, marning, dan sampel-sampel lain dengan menstabilkan beberapa hal kritis, yaitu laju penetesannya, terutama pada aliran kolom pertama dan terakhir. Pada pengaliran pertama (tahap pengikatan) dan pengaliran terakhir (tahap elusi sampel) tidak dilakukan pemompaan, aliran hanya berdasarkan kekuatan gravitasi, sehingga laju alir lebih seragam dan proses pengikatan dan proses denaturasi protein antibodi lebih optimal. Selain itu, proses pembilasan diusahakan agar lebih seragam antar ulangan sampel, yaitu 1-2 tetes/detik. Walaupun waktu yang diperlukan sedikit lebih lama, namun presisi hasil yang diperoleh meningkat secara signifikan. Data hasil pengujiannya dapat dilihat pada **Tabel 6**.

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.

Tabel 6. Data hasil pengujian Fluorometer tahap 2.

No	Nama sampel	Ulangan (ppm)			Rata-rata (ppm)	SD	% RSD
		1	2	3			
1	Jagung popcorn 4	4.2	3.9	4.1	4.07	0.15	3.7
2	Marning 3	2.2	1.9	2.4	2.17	0.25	11.5
3	Jagung segar	1.0	1.2	1.2	1.13	0.12	10.6
4	Corn Flakes	2.9	2.7	3.1	2.90	0.20	6.9
5	Tepung Maizena	2.4	2.3	2.0	2.23	0.21	9.4
6	Popcorn	2.0	2.1	2.4	2.17	0.21	9.7
7	Snack popcorn	2.7	2.0	3.1	2.60	0.55	21.15

Hasil yang diperoleh menunjukkan presisi ulangan yang jauh lebih baik dibandingkan pengujian sebelumnya. Nilai RSD yang diperoleh <13 %, kecuali untuk sampel snack popcorn, yang diduga akibat tingkat *recovery* kolom yang kurang seragam. Hal ini membuktikan bahwa keseragaman aliran kolom imunoafinitas merupakan tahap kritis yang dapat mempengaruhi hasil akhir. Pengujian jagung segar memberikan hasil dengan presisi yang sangat baik, yaitu 1.0, 1.2, dan 1.2 ppm, hal ini karena jagung segar memang merupakan salah satu sampel yang telah dioptimasi pengujiannya oleh manufaktur produsen FumoniTest, selain sorgum dan pakan ternak dengan konsentrasi 17 %. Bila sangat diperlukan, proses optimasi suatu sampel yang khas atau baru dapat dilakukan dengan mengirim sampel pada pusat *Vicam Company* di Amerika Serikat.

Metode deteksi dengan FumoniTest fluorometer ini memiliki limit deteksi 0.25 µg/g, dengan kisaran pengujian 0-10 ppm. Beberapa nilai yang diperoleh terdeteksi di bawah nilai limit deteksinya. Nilai ini dilaporkan sebagai < 0.25 ppm.

HASIL PENGUJIAN FLUOROMETER

Sampel-sampel yang diuji antara lain jagung, jagung popcorn, popcorn, tortilla, cornflakes, snack popcorn, tepung maizena dan marning. Jagung segar merupakan salah satu sampel yang telah dioptimasi untuk metode ini, dan presisi yang diperoleh sangat baik. Fumonisin total yang terdeteksi pada jagung segar dengan kondisi visual baik (**Gambar 7**) adalah

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.

1.13 ppm. Nilai ini masih di bawah batas regulasi SNI 2009, yaitu 2 ppm untuk jenis pangan jagung segar.



Gambar 7. Sampel uji jagung segar dengan kondisi visual baik.

Tangendjaja *et al.* (2008) pernah menguji kontaminasi pada jagung-jagung lokal di Indonesia dan menemukan bahwa fumonisin merupakan mikotoksin tertinggi yang ditemukan (diikuti dengan deoksinivalenol, zearalenon, dan okratoksin) yaitu 1,193 ppm. Namun konsentrasi kontaminasi fumonisin ini sangat bervariasi bergantung pada asal daerah, iklim, teknologi pemanenan, metode pengeringan pascapanen, dan kadar air jagung.

Konsentrasi fumonisin pada sampel-sampel dengan penampakan baik umumnya berada pada kisaran beberapa ratus ppb hingga 2 ppm. Pada sampel-sampel yang pecah ataupun berkapang umumnya dapat mencapai 14 hingga 30 kali lebih tinggi (Desjardins dan Plattner, 1998). Namun pada pertanian rumah di Cina, Chu and Li (1994) menemukan konsentrasi fumonisin yang tinggi (30 hingga 40 ppm) pada sampel dengan biji sehat secara visual dan hanya 2 hingga 3 kali lebih rendah dibanding sampel terkontaminasi kapang yang tebal. Hal ini membuktikan bahwa deteksi fumonisin tidak cukup hanya dilakukan secara visual, perlu uji laboratorium untuk pembuktiannya.

Jagung banyak digunakan dalam pembuatan berbagai produk pangan dan menjadi obyek dari berbagai metode pengolahan. Saat ini, berbagai efek pengolahan terhadap konsentrasi fumonisin banyak diinvestigasi. Berbagai pengolahan dilaporkan menyebabkan perubahan struktur pada fumonisin, menghasilkan beberapa derivat fumonisin seperti *hydrolysed fumonisin* atau *N-acetylated fumonisin*. Berbagai derivat fumonisin ini mungkin saja memiliki sifat kimia yang sangat berbeda dari fumonisin murni, termasuk sifat polaritas

dan kelarutannya. Sehingga banyak kemungkinan yang menyebabkan derivat-derivat ini tidak ikut terdeteksi, misalnya: sulit terekstrak pada pelarut yang digunakan, tidak dikenali antibodi pada tahap isolasi, ataupun memiliki waktu retensi yang berbeda pada tahap separasi. Selain itu, masalah utama pada studi-studi ini yaitu fakta bahwa perubahan struktur atau pengurangan fumonisin yang terdeteksi belum tentu menghasilkan pengurangan toksisitas. Sehingga pengembangan metode produk-produk derivat fumonisin masih perlu dikembangkan.

Konsentrasi kontaminan fumonisin pada produk-produk olahan jagung ini sangat bergantung pada beberapa hal, yaitu derajat kontaminasi jagung awal dan prosedur pengolahan dalam membuat produk akhir, yang mungkin melibatkan degerminasi, nixtamalisasi, ekstrusi, penggilingan, serta penambahan ingredien tertentu. Selain itu kemungkinan terjadinya rekontaminasi pada produk akhir, juga dapat mempengaruhi jumlah fumonisin yang terdeteksi.

Hasil pengujian rata-rata konsentasi fumonisin total tertinggi terdeteksi pada sampel jagung popcorn (4.07 ppm). Sampel-sampel cornflakes, tepung maizena, dan snack popcorn terdeteksi pada konsentrasi 2.90, 2.23, dan 2.60 ppm secara berurutan. Dan konsentrasi fumonisin terendah terdeteksi pada contoh sampel popcorn dan marning, yaitu keduanya 2.17 ppm. Literatur mengenai konsentrasi fumonisin pada produk-produk olahan jagung di Indonesia masih terbatas, namun beberapa penelitian di negara lain menunjukkan penurunan konsentrasi fumonisin pada produk akhir akibat proses pengolahan. Beberapa pengujian produk-produk jagung di antaranya yaitu *The Popcorn Institute* di Amerika Serikat mengindikasikan bahwa konsentrasi fumonisin pada jagung popcorn yang telah bersih mengandung fumonisin dengan kadar bervariasi dari tidak terdeteksi hingga 2.8 ppm. Sedangkan pengujian popcorn di Brazil menemukan bahwa sekitar 92 % sampel-sampel popcorn yang dianalisis terkontaminasi dengan FB1 hingga 1.24 ppm (Caldas and Silva, 2007). Untuk kripik tortilla, konsentrasi FB1 berkurang sekitar 60 % bila dibandingkan dengan bahan awal jagungnya, namun kadang hasil yang diperoleh kurang konsisten yaitu sekitar 40-80 % (Saunders *et al.*, 2001).

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.

Dari pengaruh berbagai pengolahan ini, idealnya produk-produk olahan jagung seharusnya mengandung fumonisin dengan konsentrasi lebih kecil dibanding komoditi jagung sebelum diolah (Pineiro *et al.*, 1999). Selain adanya pengenceran massa jagung, perubahan struktur fumonisin dapat menyebabkan fumonisin tidak terdeteksi dengan metode ini. Dari hasil yang diperoleh pada pengujian, produk-produk olahan jagung (jagung popcorn, marning, popcorn, tortilla, cornflakes, tepung maizena, dan snack popcorn) menunjukkan nilai-nilai yang relatif tinggi dibanding yang tertera pada literatur dan melebihi batas regulasi SNI fumonisin.

Ada beberapa kemungkinan yang dapat disimpulkan dari hasil ini, yaitu bahan baku jagung yang digunakan untuk pembuatan produk-produk olahan tersebut mengandung fumonisin relatif tinggi (kualitas kurang baik). Selain itu terjadinya rekontaminasi pada produk akhir juga dapat mempengaruhi hasil yang diperoleh, terutama pada beberapa sampel yang merupakan produk industri rumah tangga. Kemungkinan terakhir yaitu metode ini mungkin kurang akurat bila digunakan untuk sampel-sampel yang tidak disebutkan pada instruksi manualnya. Shephard (2007) dalam *General Referee Report AOAC* menyatakan bahwa pengujian dengan kolom imunoafinitas pada sampel di luar matriks-matriks yang telah tervalidasi sebaiknya melibatkan tahap kromatografi agar lebih meyakinkan. Bagaimanapun deteksi FumoniTest fluorometer ini merupakan metode skrining, sering terjadi kesalahan positif, di mana hasil yang diperoleh bergantung pada banyak faktor, yaitu terjadinya *cross-reactivity* dan kondisi-kondisi seperti suhu, viskositas sampel, pH, serta kekuatan ion juga turut mempengaruhi. Oleh karena itu diperlukan metode konfirmasi untuk memperoleh hasil yang lebih pasti dan kuantitatif, dalam hal ini yaitu pengujian dengan HPLC.

TAHAP AWAL METODE KONFIRMASI VICAM FUMONITEST HPLC

Dalam riset pengembangan metode analisis ini juga akan digunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sebagai instrumen analisis karena kemampuannya yang bersifat kuantitatif. Untuk deteksi

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.

fumonisin, yang banyak diterapkan adalah teknik kromatografi fase terbalik, di mana komponen fase geraknya lebih polar dibanding fase diamnya, hal ini memungkinkan pengujian yang lebih murah dan ramah lingkungan. Pembahasan langkah-langkah awal deteksi fumonisin dengan HPLC secara terperinci adalah sebagai berikut :

1. Pengkondisian Instrumen HPLC

Proses pengkondisian instrumen HPLC harus dilakukan sebelum proses pengujian metode baru. Proses ini dilakukan dengan mengatur parameter-parameter instrumen sesuai dengan parameter metode uji, selain itu dilakukan juga proses pembilasan kolom untuk menghilangkan kotoran-kotoran dan ion-ion pada kolom dari pengujian sebelumnya sehingga akan diperoleh hasil yang akurat dan peak analit yang murni. Pada pencarian kondisi analisis akan divariasikan beberapa kondisi dan komposisi fase gerak. Optimasi laju alir tidak diperlukan, karena perubahan laju alir justru mengubah waktu retensi peak kromatogram yang terbentuk (Harahap *et al.*, 2005). Pengaturan langsung dilakukan terhadap jenis dan panjang gelombang detektor, suhu kolom, dan laju alir.

Pada proses pembilasan, seluruh fase gerak, pembilas, dan larutan sampel yang akan dialirkan pada kolom HPLC harus disaring dan direndam dalam *degasser* terlebih dahulu. Penyaringan fase gerak ini sangat krusial mengingat ukuran filter inlet kolom yang sangat kecil (2 μm), partikel-partikel debu pada fase gerak atau larutan sampel yang belum disaring akan sangat mudah menyumbat filter inlet kolom atau dasar kolom bagian atas. Penghilangan gas bertujuan untuk mencegah adanya gelembung udara pada fase gerak yang dapat terikut di dalam kolom, hal ini dapat menyebabkan garis dasar yang tidak stabil pada kromatogram. Untuk perawatan instrumen HPLC yang baik, proses penyaringan dan degassing fase gerak harus dilakukan setiap hari saat akan digunakan.

Pengkondisian kolom HPLC dilakukan dengan mengalirkan aquades, metanol, atau campurannya yang telah disaring dan bebas gelembung dengan laju alir yang ditingkatkan secara bertahap.

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 meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Peningkatan laju alir yang bertahap (**Lampiran 3**) bertujuan untuk mencegah kenaikan tekanan yang terlalu drastis, yang dapat menyebabkan kerusakan kolom. Terdapat beberapa masalah yang sering dialami dalam pengkondisian ini, antara lain tekanan yang terlalu tinggi, garis dasar yang tidak stabil, dan kebocoran.

Tekanan kolom yang terlalu tinggi merupakan masalah utama yang sering terjadi pada proses ini. Bila tekanan terlalu tinggi (>150 kgf pada laju alir 1ml/menit), tidak bisa dilakukan penginjeksian sampel. Bila dilakukan, proses *running* akan berhenti otomatis ketika tekanan mencapai batas maksimum (faktor keamanan), sehingga proses separasi sampel tidak tuntas. Beberapa hal yang diduga menjadi penyebab tingginya tekanan pada kolom, antara lain: saringan awal (*line filter*) tersumbat, aliran fase gerak tersumbat, atau diameter bagian dalam selang yang terlalu kecil. Beberapa hal yang dilakukan untuk mengatasi masalah ini, yaitu pembalikan dan pembilasan kolom dengan aquades saring (laju alir 0.5 ml/menit) secara *overnight*, serta pembongkaran komponen filter untuk dibersihkan (perendaman ultrasonik). Kedua langkah ini berhasil menurunkan tekanan hingga mencapai nilai normalnya. Untuk proses perawatan yang baik, bila terdapat indikasi peningkatan tekanan di atas nilai normalnya, segera dilakukan proses pembilasan dan pencucian saringan, sehingga akan meningkatkan masa pakai kolom HPLC.

Masalah garis dasar (*baseline*) yang berfluktuatif dapat terjadi akibat pompa yang tidak stabil atau kolom yang masih kotor. Pompa yang tidak stabil mungkin diakibatkan oleh adanya gelembung udara pada fase gerak. penyelesaian masalah ini dilakukan dengan memperlama proses *degassing* fase gerak dan pembilasan kolom *overnight* hingga kolom bersih dan diperoleh garis dasar yang stabil. Sedangkan masalah kebocoran mudah terjadi pada ujung-ujung pemasangan sambungan kolom yang tidak pas. Namun terjadinya kebocoran ini akan mematikan pompa secara otomatis untuk faktor keamanan.

Setelah diperoleh kondisi instrumen yang baik, dilakukan ujicoba pengaliran fase gerak, yaitu metanol:0.1 M NaH_2PO_4 (77:23,v/v) dengan

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 meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

nilai pH 3.3. Pengaliran fase gerak ini mengindikasikan sedikit peningkatan tekanan pada kolom, namun masih dalam kisaran normal. Proses pembilasan akhir penting dilakukan setelah pengaliran fase gerak ini, yaitu pengaliran aquades saring 100 %, aquades:metanol(70:30, v/v), serta metanol 100 % dengan laju alir bertahap sehingga tidak meninggalkan kotoran-kotoran yang dapat membentuk kerak pada kolom.

2. Optimasi Fase Gerak HPLC

Banyak sekali kondisi sistem yang harus dipilih dan disesuaikan dengan analat dan matriks yang digunakan. Kondisi sistem yang sesuai dengan metode Vicam ini telah disebutkan dalam instruksi manufaktur. Namun kondisi ini tidak dapat diikuti secara keseluruhan persis seperti yang dianjurkan, karena adanya perbedaan atau keterbatasan alat. Instrumen yang tersedia di laboratorium PROM adalah HPLC seri 20 AD Shimadzu Shim-pack CLC(M), kolom fase terbalik berukuran 4.6 mm ID x 250 mm berupa tabung *stainless steel* panjang dengan partikel silika yang berbentuk bola dengan diameter partikel 5 μm dan diameter pori 100 Å (**Gambar 8**). Hal ini tidak sesuai dengan instruksi manufaktur yang menganjurkan penggunaan HPLC seri *Waters* dengan kolom fase terbalik C18 (*Waters Nova-Pak®C18*, 3.9 mm x 150 mm, 4 μm) sehingga harus dilakukan modifikasi kondisi pada instrumen agar hasil yang diperoleh baik. Salah satu proses modifikasi yang penting yaitu optimasi komposisi fase gerak karena komposisi fase gerak sangat bergantung dan harus diatur sesuai dengan karakteristik kolom LC yang digunakan (AOAC, 2002). Optimasi fase gerak ini dilakukan agar diperoleh garis dasar stabil, respon fluoresens tinggi, puncak terpisah sempurna, dan *noise* yang tidak terlalu besar.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

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

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.



Gambar 8. HPLC seri 20 AD Shimadzu

Setelah pengkondisian HPLC selesai, dilakukan uji coba penyuntikan baku untuk proses optimasi. Sebelum disuntik ke sistem HPLC, fumonisin baku harus diderivatisasi dahulu dengan campuran developer yang telah disiapkan sebelumnya dan dibiarkan selama 1 menit.

Pada penyuntikan pertama dilakukan uji coba injeksi fase gerak (tanpa fumonisin baku). Sampel fase gerak metanol: NaH_2PO_4 (77:23,v/v, pH 3.3) *isocratic deggased* ini dicampur dengan reagen developer dengan perbandingan (1:9). Uji ini dilakukan untuk mengetahui respon fluoresens dari komponen fase gerak. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada **Lampiran 12**, di mana respon fluoresens yang dihasilkan cukup tinggi, hampir mencapai 0.5 mV. Dari hasil tersebut, maka dilakukan pembilasan kolom dengan aquades saring secara *overnight*, proses ini dilakukan untuk menghilangkan *carry over effect* pada kolom dari uji-uji sebelumnya yang diduga memberikan respon fluoresens. Setelah proses pembilasan kolom, dilakukan kembali penginjeksian fase gerak dengan prosedur yang sama. Hasil ini memberikan hasil yang lebih baik, di mana latar fluoresens terdeteksi hanya pada kisaran 0.10 mV, kromatogramnya dapat dilihat pada **Lampiran 13**.

Proses selanjutnya yaitu uji coba penginjeksian larutan fumonisin baku dengan fase gerak metanol: NaH_2PO_4 (77:23,v/v, pH 3.3) *isocratic deggased*. Larutan kerja fumonisin baku 100 ppb diinjeksi tanpa tahap pencampuran dengan larutan developer, hal ini dilakukan untuk

mengetahui pengaruh keberadaan larutan developer pada kromatogram yang dihasilkan. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada **Lampiran 14** di mana sama sekali tidak ada peak yang terbentuk pada kromatogram. Hal ini membuktikan bahwa fumonisin sama sekali tidak memiliki kemampuan berfluoresens yang dapat terdeteksi dan harus dilakukan reaksi derivatisasi terlebih dahulu dengan larutan developer.

Selanjutnya dilakukan injeksi terhadap baku 100 ppb dengan perlakuan reaksi derivatisasi. Namun, waktu derivatisasi lebih dari 1 menit, yaitu mencapai 5 menit. Perlakuan ini diuji untuk mengetahui kestabilan dari derivat fumonisin-developer yang terbentuk. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada **Lampiran 15** di mana peak-peak yang terbentuk sangat buruk dan terpecah-pecah. Hal ini membuktikan bahwa waktu reaksi derivatisasi merupakan salah satu tahap kritis pada pengujian ini, di mana kestabilan derivat yang terbentuk sangat rendah dan dipengaruhi oleh waktu reaksi. Selain itu, nilai luas area peak derivat yang terbentuk bervariasi bergantung pada waktu derivatisasi, yaitu dari awal pencampuran developer hingga saat injeksi ke dalam sistem HPLC (Shimadzu, 2001). Oleh karena itu sangat krusial untuk mengontrol waktu derivatisasi secara akurat.

Setelah diketahui pentingnya waktu reaksi yang tepat, dilakukan penyuntikan kembali fumonisin baku 100 ppb dengan waktu derivatisasi selama 1 menit. Dari hasil yang diperoleh pada **Lampiran 16**, terlihat pembentukan peak-peak yang cukup tajam pada kromatogram. Namun semua kromatogram yang dihasilkan memiliki garis dasar yang tidak stabil dan *noise*-nya sangat tinggi. Hanya kromatogram injeksi baku non-developer (**Lampiran 14**) yang memiliki garis dasar yang cukup baik. Oleh karena itu dilakukan identifikasi terhadap developer yang digunakan. Setelah melakukan konfirmasi dengan teknisi Vicam, ternyata terdapat kesalahan komposisi campuran reagen (developer A dan developer B) pada prosedur yang dipakai. Seharusnya komposisi campuran reagen A dan B adalah 500:1, sedangkan komposisi yang dibuat adalah 1:1. Reagen developer B ini merupakan senyawa merkaptoetanol yang diduga berupa

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

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

asam 2-merkaptopropionat. Menurut Niderkorn *et al.* (2009), reagen merkaptotanol ini berfungsi untuk memisahkan interferen non-spesifik yang mungkin mengganggu pengikatan pada proses derivatisasi. Selain itu reagen ini juga mempengaruhi peningkatan kestabilan senyawa derivat dan efisiensi separasi peak yang terbentuk (Shimadzu, 2001). Namun penggunaan reagen ini secara berlebih akan menghasilkan kromatogram yang kurang baik/terlalu tajam (**Lampiran 13**).

Setelah mengetahui komposisi developer yang tepat, dilakukan penginjeksian fumonisin baku dengan konsentrasi 1000, 750, dan 500 ppb dengan fase gerak metanol:NaH₂PO₄ (77:23,v/v, pH 3.3) *isocratic deggased*. Setelah diderivatisasi dan diinjeksi dalam sistem HPLC, dihasilkan kromatogram-kromatogram yang dapat dilihat pada **Lampiran 17, 18, an 19**. Secara kasar kromatogram ini memperlihatkan luas area peak yang cukup linear terhadap konsentrasi baku yang diinjeksi.

Optimasi selanjutnya dilakukan terhadap komposisi fase gerak yang digunakan. Pada pengujian awal, fase gerak dibuat dengan sistem isokratik (pencampuran larutan dan pengaturan pH diluar sistem HPLC), sehingga dalam proses separasi digunakan hanya satu pompa. Proses optimasi selanjutnya yaitu pengaliran fase gerak yang dilakukan dengan dua pompa (non-isokratik), pompa A berupa larutan 0.1 M NaH₂PO₄ dengan pengaturan pH: 3.3, sedangkan pompa B berupa metanol saring yang telah dihilangkan gasnya. Selanjutnya dilakukan pengaliran larutan A dan B dengan perbandingan 23:77, v/v.

Setelah dilakukan ujicoba pengaliran fase gerak non-isokratik hingga diperoleh garis dasar dan tekanan yang baik (laju alir:0.8 ml/menit), dilakukan penginjeksian fumonisin baku 25 ppb. Penyuntikan baku ini memberikan hasil yang sangat baik, dimana respon fluoresensnya meningkat tajam (tinggi peaknya mencapai 350 mV). Intensitas respon fluoresens ini relatif setara dengan hasil respon yang diperoleh Meiser (1999) pada pengujian fumonisin baku dengan HPLC derivatisasi OPA. Menurut Shephard (2007), pH fase gerak memiliki korelasi positif dengan respon fluoresens. Hal inilah yang mendasari

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

tingginya respon fluoresens pada kromatogram, karena pengaliran terpisah pada campuran fase gerak akan menurunkan konsentrasi H^+ pada campuran fase gerak akhir. Selain itu, garis dasar yang dihasilkan sangat baik dan pengotor sangat rendah (**Lampiran 20**). Namun terdapat dua peak yang masih agak menyatu, sehingga perlu dilakukan uji coba beberapa komposisi fase gerak lain.

Uji coba selanjutnya dilakukan penyuntikan fumonisin baku 25 ppb, dengan fase gerak metanol:0.1 M NaH_2PO_4 (pH 3.3) yang dibuat terpisah dengan persentase pencampuran (75:25, v/v). Dari hasil yang ditunjukkan pada **Lampiran 21**, terlihat bahwa separasi peak yang terbentuk pada kromatogram lebih baik, sangat sedikit pengotor yang muncul, serta respon fluoresensnya tinggi. Namun dilakukan uji coba lanjutan dengan persentase fase gerak (70:30, v/v) untuk mengetahui pengaruhnya terhadap peak. Hasil yang diperoleh dapat terlihat pada **Lampiran 22**, di mana terbentuk tiga peak pada kromatogram dengan kaki yang saling berhimpitan. Hasil menunjukkan bahwa fase gerak ini memberikan pembentukan peak dengan pola berbeda, yaitu terbentuknya peak yang terbelah (*splitting*), sehingga komposisi ini tidak digunakan. Hal ini akibat perbedaan komposisi pada fase gerak menyebabkan perbedaan kandungan garam dan pH pada fase gerak tersebut yang dapat mempengaruhi pembentukan peak.

Untuk menunjang pemilihan hasil yang diperoleh, dilakukan perbandingan secara langsung waktu retensi peak pada tiap-tiap komposisi fase gerak terhadap kromatogram hasil pada Manual Instruksi Vicam (untuk HPLC). Namun waktu retensi yang diperoleh pada pengujian tidak sama persis dengan yang diperoleh pada manual instruksi, hal ini akibat kondisi kolom yang tidak sama dan beberapa perubahan komposisi fase gerak yang telah dilakukan.

Pada manual instruksi, penginjeksian beberapa konsentrasi fumonisin (1.73 dan 2.5 ppm) menghasilkan kromatogram dengan peak FB1 pada waktu retensi ± 5.5 menit dan FB2 ± 12.5 menit. Hasil kromatogram dengan komposisi fase gerak metanol : NaH_2PO_4 (pH:3.3)

77:23 (v/v), terbentuk peak pada waktu retensi ± 7.6 menit dengan luas area cukup besar (9.333.586), namun tidak ada peak yang terbentuk pada kisaran menit ke 12 (FB2).

Pada komposisi fase gerak 75:25 (v/v), terbentuk peak dengan waktu retensi ± 7.6 menit dengan luas area cukup besar (8.579.788) dan pada menit ke 11.3 terbentuk peak dengan luas 147.023 yang diduga fumonisin B2. Sedangkan pada komposisi fase gerak 70:30 (v/v), peak yang terbentuk lebih banyak, terpecah menjadi tiga peak, sehingga luas area yang terdeteksi rendah. Dari hasil yang diperoleh ini, komposisi fase gerak metanol: NaH_2PO_4 (pH: 3.3) dengan perbandingan 75:25, v/v memang memberikan hasil yang paling baik.

3. Perbedaan Tahapan FumoniTest HPLC dengan FumoniTest Fluorometer

Metode FumoniTestTM HPLC ini sebenarnya memiliki prinsip yang relatif sama dengan metode FumoniTestTM fluorometer, namun terdapat beberapa perbedaan pada tahapan pengujiannya. Perbedaan tahapan metode pengujian FumoniTest antara fluorometer (metode skrining) dengan metode HPLC (metode konfirmasi) dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Selain beberapa perbedaan pada **Tabel 7**, kedua metode ini memiliki tahapan dan prinsip yang relatif sama, yaitu proses isolasi fumonisin dengan kolom imunoafinitas dan deteksi analit termodifikasi berdasarkan kemampuan fluoresensnya. Beberapa perlakuan yang berbeda pada FumoniTest HPLC bertujuan untuk memperoleh hasil yang lebih kuantitatif, karena instrumen yang digunakan jauh lebih sensitif.

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.

Tabel 7. Perbedaan tahapan antara metode FumoniTest fluorometer dan HPLC (Vicam, 2004)

No	Tahapan Metode	FumoniTest Fluorometer	FumoniTest HPLC
1	Tahap blending sampel	Waktu blending 1 menit (<i>medium</i>)	Waktu blending 5 menit (<i>medium</i>)
2	Tahap pengenceran ekstrak	Menggunakan 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer sebagai larutan pengencer	Menggunakan larutan PBS sebagai larutan pengencer
3	Tahap isolasi fumonisin	Dua kali proses pembilasan dengan 10 ml larutan 0.1 % Tween-20/PBS wash buffer yang dilanjutkan dengan 10 ml larutan PBS	Satu kali pembilasan dengan larutan PBS 10 ml
4	Tahap elusi fumonisin	1 ml metanol grade HPLC	1.5 ml metanol grade HPLC
5	Pasca tahap elusi	Langsung diderivatisasi	Eluen dikeringkan secara vakum dan dilarutkan kembali dalam dalam larutan metanol:miliQ (50:50, v/v) sebanyak 200 μ l
6	Tahap derivatisasi	Menggunakan larutan developer A khusus fluorometer	Menggunakan larutan A developer khusus HPLC
	Tahap deteksi	Langsung dideteksi pada fluorometer	Diseparasi pada kolom HPLC, lalu dideteksi dengan detektor fluoresens

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 kritikan atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

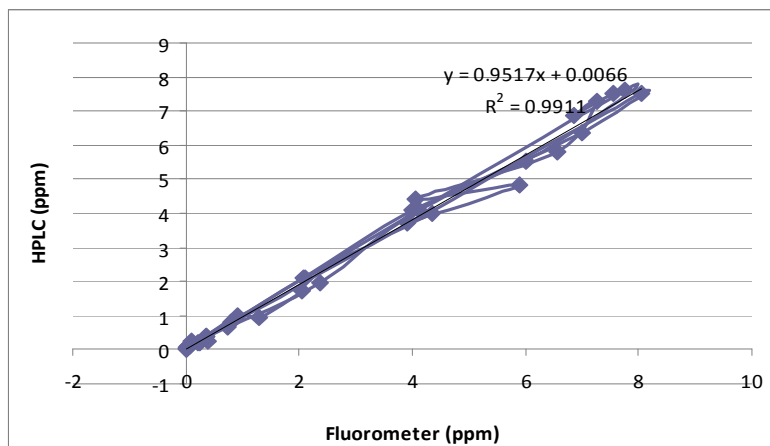
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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.

F. KORELASI HASIL FUMONITEST FLUOROMETER DAN HPLC.

Metode konfirmasi (reference) pada dasarnya memiliki dua tujuan, yaitu untuk keperluan konfirmasi sampel yang terdeteksi mengandung analit, berdasarkan uji skrining cepat dan untuk memperoleh data yang lebih kuantitatif akurat terhadap jumlah toksin yang ada. Untuk tujuan pertama, maka diperlukan suatu uji korelasi untuk membandingkan kesesuaian hasil uji yang diperoleh dari metode Fluorometer dan HPLC. Data korelasi ini merupakan data sekunder dari Vicam Company, yang disediakan ketika pembelian instrumen. Data ini selanjutnya dianalisis dengan regresi linier untuk mengetahui tingkat korelasinya. Sampel-sampel yang digunakan untuk uji ini terdiri dari 33 lot jagung (17 sampel jagung yang terkontaminasi secara alami dan 16 sampel yang dispike dengan konsentrasi yang beragam dari 0.1 hingga 10 ppm). Kurva korelasi antara metode fluorometer dan HPLC dapat dilihat pada **Gambar 9**, dan data lengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 23**.



Gambar 9. Kurva korelasi metode Fluorometer dan HPLC.

Dari kurva ini terlihat bahwa metode FumoniTest fluorometer dan FumoniTest HPLC memiliki korelasi yang baik, yang ditunjukkan dari nilai r yang diperoleh, yaitu 0.996. Sehingga penggunaan metode FumoniTest fluorometer sebagai metode skrining cocok dipasangkan dengan penggunaan metode FumoniTest HPLC sebagai metode konfirmasinya.