



Penetapan Kadar Aflatoksin B1, B2, G1, dan G2 pada Olahan Kacang Tanah dengan Metode HPLC

Andalusia Trisna Salsabila [✉], Rike Maya Wardhani, Ary Chodijayanti, Puryani, Damat, Rista Anggriani

Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian Perternakan, Universitas Muhammadiyah Malang, Indonesia

DOI: <http://dx.doi.org/10.26623/jtphp.v16i1>

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Disubmit
Direvisi
Disetujui

Keywords:

Aflatoxin; peanut;
immunoaffinity; HPLC

Abstrak

Kacang tanah (*Arachis hypogaea* L) memiliki banyak manfaat seperti mencegah peningkatan kadar kolesterol, pencegahan keriput, kandungan serat tinggi, sumber energi dan pencegahan kanker. Akan tetapi jika dalam proses pemanenan, penyimpanan serta pengolahannya yang tidak sesuai, maka kacang tanah terkontaminasi aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan. Batas kadar cemaran aflatoksin pada kacang tanah dan hasil olahannya diatur dalam Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2018. Penelitian ini bertujuan menetapkan kadar kontaminasi aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 pada olahan kacang tanah dengan prinsip ekstraksi menggunakan *immunoaffinity column* dengan instrumen *High Performance Liquid Chromatogram* (HPLC) detektor fluoresen. Hasil menunjukkan bahwa kromatogram baku kerja Aflatoksin G1, G2, B1, dan B2 berturut-turut menunjukkan respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi 6,966 menit, 8,395 menit, 12,806 menit dan 10,395 menit. Hasil kromatogram sampel yang diuji tersebut memberikan respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi yang berbeda dengan baku aflatoksin. Sehingga kedua sampel tersebut dapat disimpulkan tidak terdeteksi mengandung aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 dengan nilai LOD aflatoksin G1 sebesar 0,8311 ng/mL, aflatoksin G2 sebesar 0,0941 ng/mL, aflatoksin B1 sebesar 0,3046 ng/mL dan aflatoksin B2 sebesar 0,3143 ng/mL.

Abstract

Peanuts (*Arachis hypogaea* L) have many benefits such as cholesterol maintenance, prevention of wrinkles, high fiber content, energy source and cancer prevention. In the other hand, peanuts can contain allergens for some people, and could be contaminated with dangerous aflatoxins. Aflatoxin contamination in peanuts and their processed products is regulated in the Regulation of Indonesian FDA Number 18 of 2018. The purpose of this study is to determined aflatoxin B1, B2, G1 and G2 contamination in processed peanuts using an immunoaffinity column extraction by High Performance Liquid Chromatogram (HPLC) instrument with fluorescent detector. The results showed that the standard chromatograms of Aflatoxin G1, G2, B1, and B2 respectively showed a response to peak formation at retention times of 6,966 minutes, 8,395 minutes, 12,806 minutes and 10,395 minutes. The results of the chromatogram of the tested samples gave a response to the formation of peaks at different retention times with aflatoxin standards. So that the two samples were not detected to contain aflatoxins B1, B2, G1 and G2 with a LOD value of aflatoxin G1 of 0,8311 ng/mL, aflatoxin G2 of 0,0941 ng/mL, aflatoxin B1 of 0,3046 ng/mL and aflatoxin B2. of 0,3143 ng/mL.

[✉] Alamat Korespondensi: Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian Perternakan, Universitas Muhammadiyah Malang, Indonesia
E-mail: andalusia.t.salsabila@gmail.com

PENDAHULUAN

Kacang tanah (*Arachis hypogaea* L) adalah polong-polongan atau legum dari famili Leguminosae. Setelah kedelai, kacang tanah merupakan bahan baku terpenting kedua di Indonesia. Sebagai tanaman pangan, kacang tanah dipanen menjadi biji kemudian diolah dengan cara direbus, digoreng, atau dipanggang. Kacang tanah kaya akan lemak dan protein. Selain itu, kacang tanah juga mengandung zat besi, vitamin E dan kalsium, vitamin B kompleks, dan fosfor (Raespati et al., 2013). Perkembangan produk olahan kacang-kacangan dewasa ini dan masa yang akan datang memfokuskan pada pemanfaatan komponen aktif yang terkandung dalam kacang-kacangan sebagai sumber pangan fungsional. Komponen-komponen yang saat ini sudah dikembangkan baru terbatas diperoleh dari kedelai yaitu protein dan isoflavon, komponen lain yang berpotensi untuk dikembangkan adalah oligosakarida, *phytate*, saponin, dan *trypsin inhibitor*. Komponen-komponen aktif yang terkandung dalam kacang-kacangan selain kedelai belum banyak diungkap (Kanetro, 2018). Batas maksimum cemaran aflatoksin pada kacang tanah dan hasil olahannya, telah diatur dalam Peraturan Badan POM Nomor 18 Tahun 2018, yaitu cemaran aflatoksin B1 maksimum 15 ppb dan total cemaran aflatoksin (G1+G2+B1+B2) adalah sebesar 20 ppb.

Aflatoksin adalah mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* atau *Aspergillus nomius*. Ketiga jenis kapang ini dapat tumbuh pada makanan pokok seperti biji-bijian, kacang-kacangan, rempah-rempah dan kopra. Bisa juga tumbuh pada produk olahan seperti bumbu pecel dan tempe. Ada empat aflatoksin alami yang paling umum dan beracun, yaitu: aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 (Winarno, 2008). Aflatoksin B1 merupakan dan karsinogen yang sangat kuat, menyebabkan banyak efek sistemik berbahaya dan efek samping yang mengganggu fungsi organ dan jaringan, menghambat pertumbuhan, peradangan, immunosupresi, dan kanker hati manusia (Wogan et al., 2012). Pengolahan yang tidak tepat dan perubahan iklim dapat menurunkan kualitas bahan pangan. Iklim yang lembab dapat mendorong pertumbuhan mikroorganisme yang dapat mencemari bahan pangan selama pra atau pasca panen. Selain itu, proses penyimpanan dan pengeringan yang tidak tepat dapat meningkatkan pertumbuhan *Aspergillus* dalam bumbu, rempah-rempah dan kacang-kacangan (Ozbey & Kabak, 2012).

Pentingnya penetapan kadar aflatoksin didasarkan pada wabah aflatoksin akut di Kenya pada tahun 2004, konsumsi jagung yang terkontaminasi aflatoksin tingkat tinggi, telah menelan korban sebanyak 317 kasus, membunuh 125 kasus. Pada tahun 2013 Rumania, Serbia dan Kroasia melaporkan wabah kontaminasi aflatoksin dalam susu di tingkat nasional (Kumar et al., 2017). Kasus serupa dilaporkan terjadi di Indonesia pada tahun 1972, 1974, dan 1977, namun tanpa korban jiwa yang pasti (Broto, 2018). Cemaran aflatoksin di Indonesia telah diteliti terutama pada bahan baku jagung dan kacang tanah yang sebagian besar berasal dari sentra manufaktur di Jawa dan Sumatera. Kandungan aflatoksin kacang tanah di pasar tradisional dan pedagang kaki lima Kabupaten Pasuruan adalah >10 ppb dari Maret 2005 sampai Juni 2006, sekitar >3.000 ppb (Rahmianna & Yusnawan, 2015).

Penelitian Rahmianna & Yusnawan (2015) menemukan lebih dari 10 ppb kontaminasi aflatoksin pada kacang tanah yang dijual di pasar dan pedagang tradisional, dan lebih dari 3000 ppb menggunakan metode ELISA. Menurut penelitian lain, cemaran aflatoksin kedelai adalah 107,1 ppb dari 100 gram kedelai dalam produksi sari kedelai (Utami et al., 2012).

Pada penelitian ini digunakan alat HPLC dengan menggunakan detektor fluorescence untuk mengukur kandungan aflatoksin dengan *pretreatment* dengan ekstraksi fase padat berupa ekstraksi fase padat. Ekstraksi fase padat (SPE) adalah proses pemisahan yang digunakan untuk memisahkan senyawa dari campuran menggunakan sifat fisik dan kimia. SPE merupakan metode ekstraksi yang menggunakan fase padat dan fase cair untuk memisahkan suatu jenis analit dari larutan berdasarkan distribusi analit antara fase diam dan fase cair. SPE biasanya digunakan untuk memekatkan dan memurnikan sampel untuk analisis. Selain itu, SPE dapat digunakan untuk memurnikan sampel

sebelum mengukur jumlah analit dalam sampel SPE menggunakan metode kromatografi atau metode analisis lainnya (Astuti, 2012).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin melakukan penelitian terkait dengan kontaminasi aflatoksin pada olahan kacang tanah dengan prinsip yang digunakan berupa ekstraksi pada aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 secara spesifik menggunakan *immunoaffinity column* dan ditetapkan kadarnya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatogram* (HPLC) dengan detektor fluoresence dengan detektor fluoresen.

METODE

Bahan

Sampel pangan kacang olahan (berapa jenis Kode Sampel 522 dan Sampel 2), baku pembanding aflatoksin B1, B2, G1, dan G2 bersertifikat (LRAC9021.01), KCL, KH_2PO_4 , Na_2PO_4 , NaCl, HCl, NaOH, *immunoaffinity column* (IAC) AFLAPREP®, aquades.

Alat

Seperangkat alat HPLC yang dilengkapi dengan kolom C18 (4,8 x 250 mm), ukuran partikel 5 μm ., detektor fluoresens, Alat derivatisasi Kobra® Cell, seperangkat *pump stand* atau *vacuum manifold*, *Vortex*, pH meter dan *ultrasonic bath*.

Pembuatan Larutan PBS (AOAC, 2005 yang telah dimodifikasi)

Ditimbang 0,2 gram KH_2PO_4 , Na_2PO_4 1,15 gram, dan NaCl 8 gram, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur tertutup 1 Liter, ditambahkan aquades 900 mL, lalu dikocok hingga larut, dilakukan penyesuaian pH hingga 7,4 dengan bantuan HCL 1M atau NaOH 1M menggunakan pH meter, ditambahkan aquades hingga volume akhir 1 L.

Pembuatan Larutan Uji (AOAC, 2005 yang telah dimodifikasi)

Ekstraksi

Sampel kacang dihancurkan hingga halus dengan blender, kemudian ditimbang dengan dengan seksama lebih kurang 25 gram, lalu dimasukkan ke dalam botol coklat 100 mL bertutup, ditambahkan 75mL (digunakan pipet volumetrik 50 dan 25 mL) campuran metanol aquades (80:20), dihomogenkan dengan *vortex* selama 30 detik dan di alat *ultrasonic bath* selama 10 menit pada suhu 50°C, setelah itu botol dibiarkan mencapai suhu ruang, larutan sampel disaring dengan kertas saring, filtrat ditampung dalam wadah coklat bertutup, dipipet 3 mL ke dalam wadah coklat bertutup dan ditambahkan larutan PBS, larutan dihomogenkan dengan alat *vortex* selama 30 detik.

Clean Up

Larutan hasil ekstraksi dilewatkan ke dalam IAC pada laju alir 2-3 mL/menit, kemudian wadah dibilas dengan 10 mL aquades dan dilewatkan dalam IAC, setelah itu IAC dibilas ulang dengan 10 mL aquades, dilewatkan udara ke dalam IAC menggunakan *syringe* sampai kering, analit dielusi dengan 2 x 0,5 mL metanol pada laju alir 2-3 mL/menit, eluat ditampung dalam vial coklat 5 mL.

Pembuatan Larutan Baku (AOAC, 2005 yang telah dimodifikasi)

Pembuatan Larutan Baku Induk

Baku induk aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 bersertifikat masing-masing dipipet 1,6 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian diberi larutan metanol hingga tanda batas, berikut merupakan konsentrasi baku induk masing-masing aflatoksin :

Baku Induk	Konsentrasi (ppm)
B1	1
B2	0,3
G1	1
G2	0,3

Pembuatan Larutan Baku Antara

Larutan baku induk dipipet 0,05 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian diencerkan dengan metanol hingga tanda, berikut adalah konsentrasi baku antara yang didapatkan :

Baku Antara	Volume Pipipetan (mL)	Konsentrasi (ppb)
B1	0,05	50
B2	0,05	15
G1	0,05	50
G2	0,05	15

Pembuatan Larutan Baku Kerja

Dibuat seri larutan baku kerja dalam campuran metanol:aquades (80:20) dengan kadar dan pengenceran seperti yang tertera dalam tabel berikut :

Seri	Volume Pipipetan Antara (mL)	Baku Volume (mL)	Akhir	Kadar Aflatoksin			
				B1 (ppb)	B2 (ppb)	G1 (ppb)	G2 (ppb)
1	0,003	1		0,15	0,045	0,15	0,045
2	0,010	1		0,5	0,150	0,5	0,150
3	0,050	1		2,5	0,750	2,5	0,750
4	0,100	1		5	1,50	5	1,50
5	0,200	1		10	3,00	10	3,00
6	0,300	1		15	4,5	15	4,5
7	0,600	1		30	9,0	30	9,0
8	Baku Antara	1		50	15	50	15

Penetapan Aflatoksin (AOAC, 2005 yang telah dimodifikasi)

Larutan baku dan larutan uji masing-masing disuntikkan secara terpisah dan dilakukan penetapan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* yang sudah dikondisikan sebagai berikut :

Fase gerak	: Metanol-Aquades (45:55)
Kolom	: Zorbax, C18 (4,6 x 100 mm), ukuran partikel 5 µm
Derivatisasi	: PHRED (<i>Photochemical Reactor</i>)
Detektor	: Fluoresensi, eksitasi 360 nm, emisi 40 nm
Laju air	: 1 mL/menit Volume Penyuntikan : 100 µg

Interpretasi Aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 dalam sampel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar aflatoksin B1/B2/G1/G2 } (\mu\text{g/kg}) = \frac{C_{sp} \times F}{w}$$

Keterangan :

Csp : Kadar aflatoksin B1, B2, G1, G2 yang diperoleh dari perhitungan menggunakan persamaan garis $y = bx + a$ (µg/mL)

F : Faktor pengenceran

W : Bobot sampel (gram)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem digunakan untuk menentukan apakah sistem kromatografi cocok untuk digunakan dalam analisis (Yusransyah et al., 2014). Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menyuntikkan baku kerja dengan konsentrasi yang sama sebanyak 6 kali berturut-turut. Syarat uji

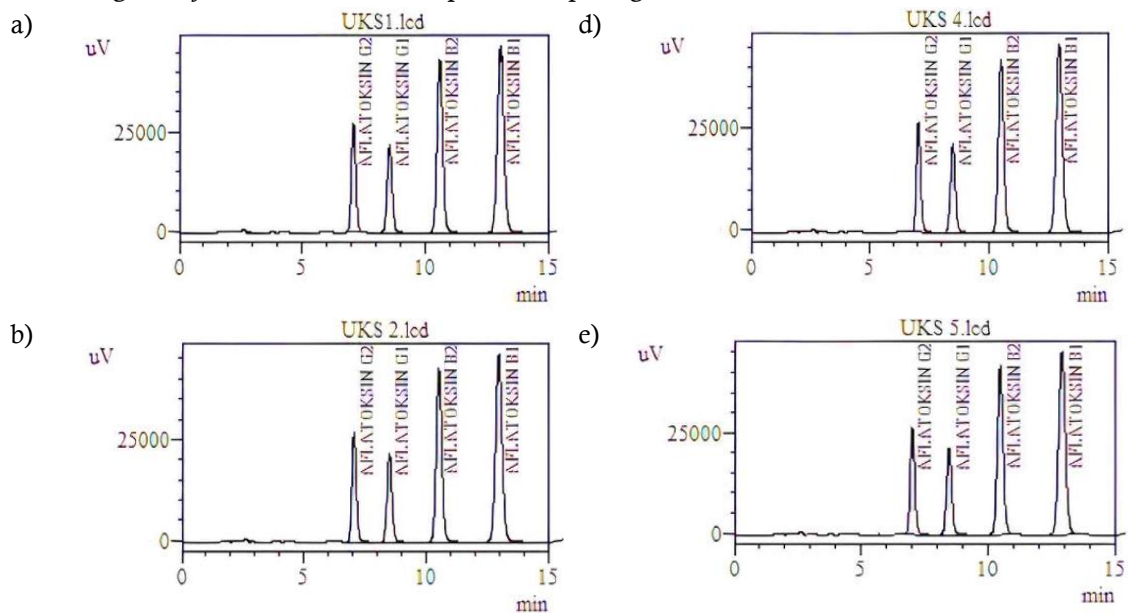
kesesuaian sistem menurut Ibrahim (2017) adalah %RSD *area* < 2%, *Tailing factor* syarat < 2, Resolusi > 1,5, dan *Theoretical Plates* minimal memiliki nilai 2000.

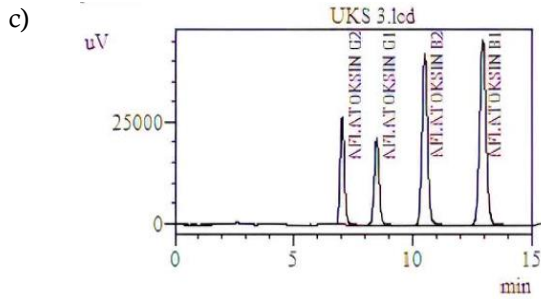
Tabel 2. Hasil Uji Kesesuaian Sistem Sampel

Senyawa	%RSD Area	Tailing Factor	Resolusi	Theoretical Plates
Aflatoksin G1	1,601	1,089	3,008	7925,056
Aflatoksin G2	1,282	1,110	0,000	6754,840
Aflatoksin B1	1,572	1,068	5,268	10798,970
Aflatoksin B2	1,912	1,07029	4,989	9551,507

Tabel 2 menunjukkan bahwa semua baku kerja yang diidentifikasi memiliki nilai %RSD *area* < 2%, nilai *tailing factor* < 2, nilai resolusi > 1,5% serta nilai *Theoretical Plates* lebih dari 2000. Sehingga dapat disimpulkan bahwa instrumen kromatografi memiliki kondisi yang baik untuk diterapkan dalam analisis. Namun pada aflatoksin G2, memiliki nilai resolusi 0,000. Hal ini dikarenakan baku aflatoksin G2 merupakan analit pertama yang dideteksi oleh instrumen HPLC. Sedangkan pada baku kerja yang lain memiliki nilai > 1,5. Resolusi merupakan nilai yang menyatakan pemisahan *peak* pada kolom. Jika nilai Resolusi adalah $R > 1,5$ merupakan harga resolusi ideal, dimana dua puncak terpisah secara sempurna. Bila pada suatu analisis diperoleh $R < 1,5$ maka untuk meningkatkan harga R oleh fase diam dapat dilakukan dengan menggunakan kolom yang lebih panjang sehingga menambah jumlah plat teoritis (Susanti & Dachriyanus, 2015).

Terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga membentuk kromatogram yang tidak simetris disebut faktor simetri. Jika harga TF (*Tailing Factor*) adalah sama dengan 1, maka kromatogram tersebut simetris. Semakin besar harga TF, maka semakin tidak efisien kolom yang akan dipakai. yang diperlukan untuk mencapai terjadinya satu kali keseimbangan distribusi dinamis molekul analit dalam fase gerak dan fase diam disebut *Theoretical Plate* (Susanti & Dachriyanus, 2015). Kromatogram uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada gambar 1.





Gambar 1. (a) Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem 1, (b) Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem 2, (c) Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem 3, (d) Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem 4, (e) Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem 5

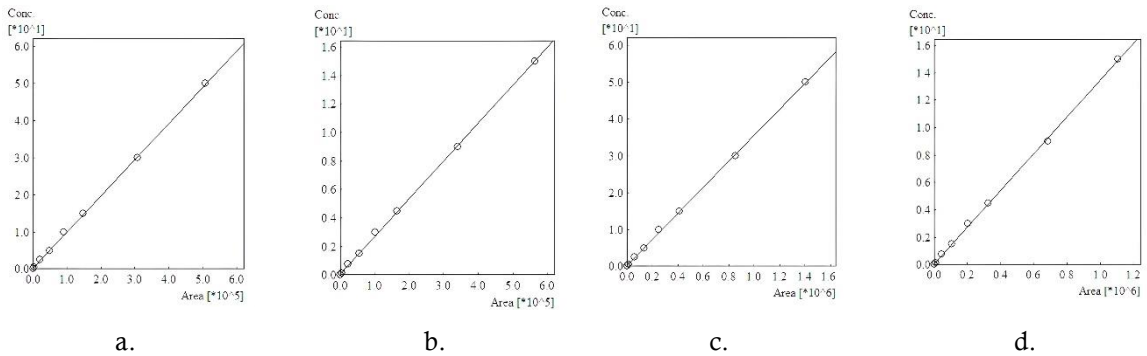
Uji Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan menyuntikkan larutan baku kerja dengan berbagai konsentrasi. Kurva linear dikalibrasi dan diperoleh dengan mendapatkan area puncak (*peak*) terhadap masing-masing aflatoksin.

Tabel 3. Uji Linearitas Aflatoksin G1, G2, B1 dan B2

Aflatoksin	Persamaan Linear	r
G1	$0,0000976449 X + 0,368233$	0,9998
G2	$0,0000264032 X + 0,0995231$	0,9998
B1	$0,0000353127 X + 0,303155$	0,9998
B2	$0,00000133896 X + 0,0708938$	0,9997

Tabel 3 menunjukkan bahwa semua aflatoksin yang dievaluasi menunjukkan linearitas yang baik dengan koefisien korelasi (r) > 0,99. Regresi linear yang didapat digunakan untuk mengukur konsentrasi aflatoksin dalam sampel pangan. Ketetapan aflatoksin dihitung dengan mensubstitusikan nilai X pada persamaan linear dengan nilai *area* dari sampel yang terdeteksi oleh KCKT. Grafik persamaan linear dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. (a) Grafik Linearitas Aflatoksin G1, (b) Grafik Linearitas Aflatoksin G2, (c) Grafik Linearitas Aflatoksin B1, dan (d)Grafik Linearitas Aflatoksin B2

Pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda dilakukan untuk mengukur linearitas. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Gandjar & Rohman, 2014). Penetapan kadar aflatoksin memiliki nilai koefisien korelasi sebesar 0,99.

Uji LOD dan LOQ

Batas deteksi (*Limits of Detection*) adalah jumlah terkecil analit yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi (*Limits of Quotation*) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi biasa dinyatakan dalam konsentrasi analit (misal % ppb) dari sampel. Metode non instrumen, batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Sedangkan metode instrumen, batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko (Susanti & Dachriyanus, 2015). Penelitian ini menggunakan metode instrumen (metode *Muller*), yaitu menggunakan respon dari blanko terkecil. Hasil perhitungan LOD dan LOQ pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

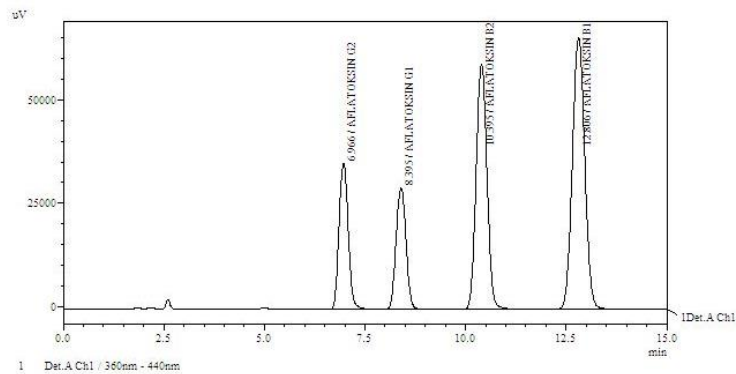
Tabel 4. Nilai LOD dan LOQ Aflatoksin G1, G2, B1 dan B2

Senyawa	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Aflatoksin G1	0,8311	2,7704
Aflatoksin G2	0,0941	0,3138
Aflatoksin B1	0,3046	1,0153
Aflatoksin B2	0,3143	1,0478

Tabel 4 menunjukkan bahwa aflatoksin G1 memiliki nilai LOD dan LOQ berturut-turut sebesar 0,8311 ng/mL dan 2,7704 ng/mL. Aflatoksin G2 memiliki nilai LOD dan LOQ berturut-turut adalah sebesar 0,0941 ng/mL dan 0,3138 ng/mL. Aflatoksin B1 memiliki nilai LOD dan LOQ berturut-turut adalah sebesar 0,3046 ng/mL dan 1,0153 ng/mL. Aflatoksin B2 memiliki nilai LOQ dan LOD berturut-turut sebesar 0,3143 dan 1,0478.

Penetapan Kadar Aflatoksin

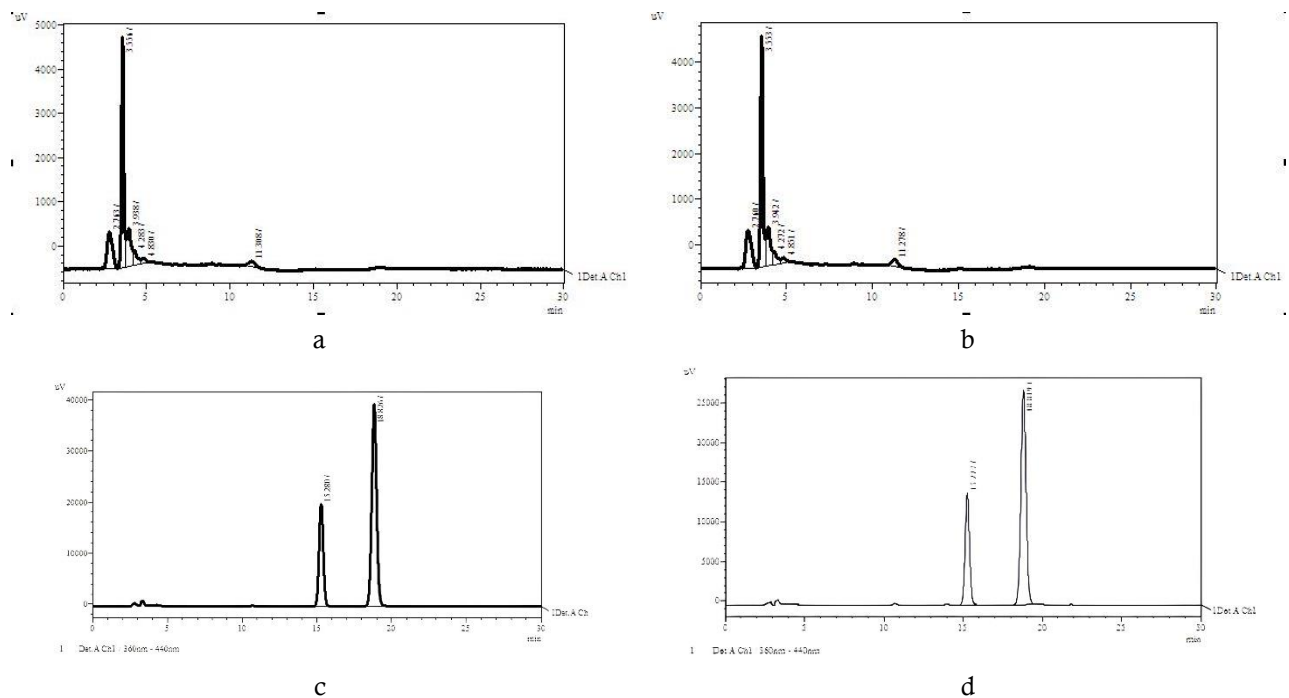
Penetapan kadar aflatoksin pada penelitian ini menggunakan instrumen HPLC. Sampel yang terdeteksi adanya aflatoksin, akan memberikan respon terbentuknya *peak* pada kromatogram. *Peak* tersebut kemudian dibandingkan dengan *peak* pada kromatogram baku, dengan memperhatikan munculnya *peak* pada waktu retensi yang sama antara kromatogram baku dengan kromatogram sampel.



Gambar 3. Kromatogram Baku Aflatoksin G1, G2, B1 dan B2

Gambar 3 menunjukkan kromatogram dari masing-masing baku aflatoksin. Aflatoksin G1, G2, B1, dan B2 berturut-turut menunjukkan respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi 6,966 menit, 8,395 menit, 12,806 menit dan 10,395 menit. Waktu retensi masing-masing baku aflatoksin yang tercatat dibandingkan dengan waktu retensi yang respon terbentuknya *peak* pada kromatogram sampel. Jika sampel memiliki respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi yang sama dengan baku aflatoksin G1, G2, B1 atau B2, maka sampel tersebut terindikasi tercemar aflatoksin.

Sampel diuji secara duplo dengan menimbang masing-masing sampel sebanyak dua kali secara seksama, kemudian dilakukan ekstraksi dan *clean up*. Masing-masing sampel dideteksi adanya cemaran aflatoksin G1, G2, B1 dan B2 menggunakan instrumen HPLC dengan detektor fluoresence. Hasil kromatogram dari masing-masing sampel dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar (4). (a) Kromatogram Sampel 552a ; (b) Kromatogram Sampel 552b ; (c) Kromatogram Sampel 594a ; (d) Kromatogram Sampel 594b

Sampel 552a menunjukkan adanya respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi 3,5517 dan sampel 552b menunjukkan adanya respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi 3,5537. Kromatogram sampel 594a menunjukkan adanya respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi 15,280 menit dan 18,826 menit. Sedangkan sampel 594b menunjukkan adanya respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi 15,273 menit dan 18, 819 menit. Kedua sampel tersebut memberikan respon terbentuknya *peak* pada waktu retensi yang berbeda dengan baku aflatoksin. Sehingga kedua sampel tersebut tidak terdeteksi mengandung aflatoksin G1, G2, B1 dan B2. Terbentuknya *peak* tersebut mengindikasikan adanya matriks lain yang dapat terpisah oleh pelarut polar seperti acetonitrile, namun bukan merupakan senyawa aflatoksin G1, G2, B1 dan B2. Perbandingan waktu retensi antara baku aflatoksin G1, G2, B1 dan B2 dengan sampel dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Waktu Retensi Baku Aflatoksin G1, G2,B1, dan B2 Serta Sampel 594a, 594b, 552a, dan 552b

Analit	Waktu Retensi (menit)
Baku Aflatoksin G1	6,966

Baku Aflatoksin G2	8,395
Baku Aflatoksin B1	10,395
Baku Aflatoksin B2	12,806
594a	15,280
594b	18,826
552a	3,5517
552b	3,5537

Selang waktu yang diperlukan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor disebut sebagai waktu retensi (*retention time*) atau waktu tambat. Waktu retensi analit yang tertahan pada fase diam dinyatakan dengan R_t (Yusransyah et al., 2014). Faktor-faktor yang mempengaruhi pada retensi adalah sifat alamiah analit, sifat alamiah fase diam (Polar dan Non Polar), komposisi, viskositas dan polaritas fase gerak, daya atau ikatan antar molekul, suhu kolom, serta laju alir fase gerak (Ibrahim, 2017).

Setelah kromatogram dari sampel didapatkan, maka dibaca waktu retensi dan luas areanya. Luas area yang didapat, disubstitusikan pada persamaan linear dan hitung untuk mendapatkan kadar masing-masing aflatoksinnya. Hasil perhitungan kadar aflatoksin setiap sampel dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 6. Kadar Aflatoksin Sampel 552 dan 594

Sampel	Kadar Aflatoksin (ppb)				Total Aflatoksin (ppb)	Rata-rata Kadar Aflatoksin (ppb)	Ket.
	G1	G2	B1	B2			
552	a	0	0	0	0	0	MS
	b	0	0	0	0	0	
594	a	0	0	0	0	0	MS
	b	0	0	0	0	0	

*Keterangan : MS (Memenuhi Syarat) ; TMS (Tidak Memenuhi Syarat)

Berdasarkan Peraturan BPOM Nomor 18 Tahun 2018, kadar aflatoksin B1 pada sediaan pangan kacang dan bumbu adalah tidak lebih dari 15 ppb. Sedangkan kadar aflatoksin total pada sediaan pangan kacang dan bumbu adalah tidak lebih dari 20 ppb. Sehingga dapat disimpulkan bahwa cemaran aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 pada sampel 552 dan 594 memenuhi syarat (MS).

Pada penelitian ini sampel diberikan perlakuan pendahuluan berupa *Solid Phase Extraction* (SPE). Hal ini bertujuan untuk memperoleh zat yang ditargetkan lebih maksimal. *Solid Phase Extraction* atau SPE adalah proses pemisahan yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dari suatu campuran, memanfaatkan sifat fisika dan kimianya. SPE merupakan metode ekstraksi yang menggunakan fase padat dan fase cair untuk mengisolasi suatu tipe analit dari suatu larutan berdasarkan partisi analit diantara fase diam dan fase cair. SPE digunakan untuk mengkonsentrasikan dan memurnikan sampel untuk analisis. Selain itu SPE dapat digunakan untuk *clean-up* sampel sebelum menggunakan metode kromatografi atau metode analisis lainnya untuk mengukur jumlah analit dalam sampel SPE (Astuti, 2012). Penelitian ini menggunakan SPE jenis *immunoaffinity column* atau kolom imunoafinitas. Pemilihan jenis SPE ini dilakukan karena ekstraksi ini bersifat spesifik mengekstraksi berdasarkan interaksi antigen dengan antibodi. Menurut Ganjdar dan Rohma (2010), terdapat empat tahap dalam melakukan prosedur SPE, yaitu : pengkondisian, pemasukan sampel

pencucian, dan elusi. Pada tahap elusi diberikan perlakuan berupa *backflushing*. Perlakuan ini merupakan perlakuan fisik yang berfungsi untuk memaksimalkan hasil ekstrak yang didapat.

Penelitian ini menggunakan instrumen KCKT dengan detektor fluoresensi. Detektor fluoresensi dipilih karena analitnya larut dalam komponen fase gerak adalah analit yang memiliki fluoresensi. Secara garis besar tahapan analisis dengan KCKT adalah penyiapan larutan uji, penyiapan larutan baku pembanding, penyuntikan, perbandingan kromatogram, serta perhitungan. Penelitian ini menggunakan fase gerak berupa air-metanol-serta asetonitril. Pemilihan fase gerak ini didasarkan pada senyawa netral dan tidak larut dalam salah satu komponen fase gerak (air, metanol atau asetonitril) (Ibrahim, 2017). Aflatoksin B1 dan B2 memiliki warna fluoresensi berupa warna biru, sedangkan aflatoksin G1 dan G2 memiliki warna hijau (Winarno, 2008).

Beberapa hal yang dapat memengaruhi tumbuhnya *Aspergillus flavus* pada kacang adalah penanganan pasca panen seperti: proses pengeringan, perontokan dan penyimpanan. Kacang tanah sangat sensitif terhadap serangan jamur, hama, dan rayap. Sehingga dalam penyimpanannya diperlukan suhu, kelembaban dan kelembaban, serta sirkulasi udara yang baik untuk mencegah tumbuhnya *Aspergillus flavus* yang dapat memproduksi mikotoksin berupa aflatoksin (Winarno, 2008). Kondisi penyimpanan yang sesuai untuk penyimpanan kacang tanah menurut Torres et al., (2014), yaitu memiliki kadar air, 7% dengan kondisi suhu 25-27°C dan RH 56-70%. Selain itu kacang tanah juga perlu dikemas dalam karung goni dan dirangkap dengan kantong plastik PE. Penyimpanan diletakkan dengan cara disusun pada rak yang tidak menempel dengan dinding ruang penyimpanan.

SIMPULAN

Penetapan aflatoksin B1, B2, G1 dan G2 pada olahan kacang tanah dilakukan dengan prinsip ekstraksi menggunakan *immunoaffinity column* dengan instrumen *High Performance Liquid Chromatogram* (HPLC) detektor fluoresen yang telah diuji kesesuaiannya dengan uji kesesuaian sistem, uji linearitas serta LOD dan LOQ. Penetapan kadar aflatoksin pada produk bumbu instan dan kacang sesuai dengan peraturan Badan POM nomor 8 tahun 2018 menunjukkan bahwa sampel kacang olahan yang diuji, tidak mengandung aflatoksin G1, G2, B1 dan B2, sehingga sampel sediaan kacang tersebut memenuhi syarat (MS).

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, N. M. W. 2012. Solid Phase Extraction. Universitas Udayana.
- AOAC. 2005. Official Method 991.31. Aflatoxins In Corn, Raw Peanuts and Peanut Butter Immunoaffinity Column (Aflatest).
- BPOM. 2018. Badan Pengawas Obat dan Makanan. Peraturan nomor 8 tahun 2018. Batas Cemaran Aflatoksin pada Sediaan Bumbu dan Kacang. Pusat Pengujian Obat Dan Makanan Badan Pengawasan Obat Dan Makanan Republik Indonesia.
- Broto, W. 2018. Status Cemaran Dan Upaya Pengendalian Aflatoksin Pada Komoditas Serealia Dan Aneka Kacang. Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian, 37(2), 81. <https://doi.org/10.21082/jp3.v37n2.2018.p81-90>
- Gandjar, G. I., & Rohman, A. 2014. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Belajar.
- Ibrahim, S. 2017. Ekstraksi Fase Padat (Solid Phase Extraction). Pelatihan NFRL Mikotoksin. Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional. BPOM-RI.
- Kanetro, B. 2018. Teknologi Pengolahan dan Pangan Fungsional Kacang-kacangan. In Journal of Chemical Information and Modeling, 53(9).
- Kumar, P., Dipendra, K., Madhu, K., Tapan, K., & Sang, G. K. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. Review: Frontiers in Microbiology, 17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Ozbey, F., & Kabak. 2012. Natural Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Spices. Journal of Food Control, 28(2), 354–361.

- Raespati, E., Hasanah, L., Wahyuningsih, S., Sehusman, Manurung, M., Supriyati, Y., & Rinawati. 2013. Buletin Konsumsi Pangan. Pusat Data Dan Sistem Informasi Pertanian, 4(1).
- Rahmianna, A., & Yusnawan, E. 2015. Monitoring of aflatoxin contamination at market food chain in East Java. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(4), 346–352.
- Susanti, M., & Dachriyanus. 2015. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Lembaga Pengembangan Teknologi Infromasi dan Komunikasi (LPTIK).
- Torres, A. M., G.G, B., S.A, P., S.N, C., & P, B. 2014. Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International*, 62, 11–19.
- Utami, T., Nugroho, F. H. A., Usmiati, S., Marwati, S., & Rahayu, E. S. 2012. Penurunan Kadar Aflatoksin B1 pada Sari Kedelai oleh Sel Hidup dan Sel Mati *Lactobacillus acidophilus* SNP-2. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, XXIII(1), 58–63.
- Winarno, F. 2008. Keamanan Pangan. PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wogan, G. ., Kensler, T. W., & Groopman, J. 2012. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma : a review. *Food Addit. Contam Part A Chem.*, 249–257.
- Yenny. 2006. Aflatoksin dan Aflatoksis pada Manusia. *Universa Medica*, 25(1), 41–52.
- Yusransyah, Maghfiroh, R., & Rochma, A. 2014. Uji Kesesuaian Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Terbalik Bahan Baku Parasetamol. *Far Magazine*, 1(2).