

## Validasi Metode Analisis Kadar Okratoksin A pada Biji Pala (*Myristica fragrans* Houtt) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Hernawaty<sup>a,1,\*</sup>, Indah Nurdiana<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Balai Pengawas Obat dan Makanan di Ambon, Jl. Dr Kayadoe SK 20 Kudamati Ambon, Indonesia, 97128

<sup>1</sup>hernawaty@pom.go.id\*, <sup>2</sup>indah.nurdiana@pom.go.id

\* corresponding author

---

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT / ABSTRAK

---

#### Article history

Received:  
06 September  
2022

Revised:  
16 Oktober 2023

Accepted:  
18 Oktober 2023

DOI:  
<https://doi.org/10.54384/eruditio.v3i2.147>

Pala (*Myristica fragrans* Houtt) merupakan komoditi unggul yang diminati oleh Uni Eropa. Agar dapat masuk ke pasar ekspor Uni Eropa, komoditi pala harus memenuhi beberapa regulasi dan persyaratan yang dapat dikelompokkan ke dalam *Legal Requirements* dan *Non-Legal Requirements*, yang pada tanggal 1 April 2020 terdapat tambahan peraturan berupa level maksimum Okratoksin A yang terkandung dalam pala yang diijinkan adalah 15 µg / kg (EUR-Lex, 2020). *Sejauh ini pengujian Okratoksin A belum pernah dilaporkan untuk ruang lingkup biji pala.* Analisis Okratoksin A secara umum menerapkan metode uji AOAC ch.49.6.64 (Penetapan kadar okratoksin dalam *barley*) dan metode uji AOAC Ch 49.6.028 (Penetapan kadar Okratoksin A dalam kopi hijau), namun metode ini diketahui tidak spesifik untuk biji pala karena spektral Okratoksin A pada sampel. *Tujuan penelitian ini* adalah untuk mendapatkan metode analisis yang valid untuk penetapan kadar Okratoksin A pada biji pala sehingga dapat diterapkan secara luas sebagai tahap penting pemenuhan persyaratan standar ekspor luar negeri produk biji pala bebas Okratoksin A. Data yang digunakan merupakan data primer validasi metode analisis menggunakan alat HPLC *fluoresense detector*. Sampel diekstraksi menggunakan pelarut organik, dengan pengenceran PBS pH 7,4 dan dilewatkan pada *Immuno Affinity Column* (IAC), dan dilusi dengan asam asetat-metanol (2:98) dan air. Hasil validasi menunjukkan spesifitas spesifik terhadap biji pala, linearitas 0,9998588 dan Vxo 1,40%, presisi RSD 2,02%, akurasi 84-87% dengan menambahkan sejumlah analit ke dalam matriks sampel untuk mendapatkan perolehan kembali, batas deteksi 1,59 µg/kg serta batas kuantitasi 5,82 µg/kg. Metode analisis tervalidasi ini memenuhi kriteria dan dapat digunakan untuk penetapan kadar Okratoksin A pada biji pala.

*Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt) is a superior commodity that is in demand by the European Union, and to enter the export market of the European Union, nutmeg commodities must meet several regulations and requirements, which can be grouped into Legal Requirements and Non-Legal Requirements. On April 1, 2020, there was an additional regulation in the form of the maximum level of Ochratoxins A contained in nutmeg that is allowed is 15 g/kg (EUR-Lex, 2020). So far, an assay of ochratoxin A has not been reported for the scope*

---

---

*of nutmeg. Ochratoxin A analysis generally applies the AOAC test method ch.49.6.64 (Assessment of ochratoxin levels in barley) and the AOAC test method Ch 49.6.028 (Assessment of ochratoxin A levels in green coffee), but this method is known to be non-specific for nutmeg because of its spectral characteristics. Ochratoxin A in samples. The purpose of this study was to obtain a valid analytical method for determining levels of ochratoxin A in nutmeg seeds so that it can be widely applied as an important step in meeting the requirements of foreign export standards for ochratoxin A-free nutmeg products. The data used is primary data validation of the analytical method using an HPLC fluorescent detector. Samples were extracted using organic solvents, with PBS pH 7.4 dilution passed to the Immuno Affinity Column (IAC) and eluted with acetic acid-methanol (2:98) and water. The validation results showed specific specificity for nutmeg, linearity 0.9998588 and Vxo 1.40%, RSD precision 2.02%, accuracy 84-87% by adding a certain amount of analyte to the sample matrix to obtain recovery, detection limit 1.59 g/kg and the quantitation limit was 5.82 g/kg. This validated analytical method meets the criteria and can be used to determine levels of ochratoxin A in nutmeg seeds.*

---

**Keywords:** : *Ochratoxin A, nutmeg, Myristica fragrans, OTA, method validation*  
**Kata Kunci** : Okratoksin A, biji pala, *Myristica fragrans, OTA, validasi metode*

---

## 1. Pendahuluan

Pala (*Myristica fragrans* Houtt) merupakan salah satu komoditas unggul yang diminati oleh masyarakat global. Ada beragam komoditi pala di Indonesia meliputi Pala Fak-Fak, Pala Makian, Pala Ternate 1, Pala Banda, Pala Tidore 1, dan Pala Tobelo (Wahyuni et al., 2016). Tanaman pala di Maluku, terutama tersebar di Pulau Ambon, Kepulauan Banda, dan Pulau Seram. Lingkungan ekologi seperti curah hujan, suhu, dan tanah vulkanik serta minimnya serangan hama penyakit sangat mendukung perkembangan tanaman pala di Maluku. Pala merupakan tanaman rempah asli kepulauan Maluku (Thangaselvabai and Sudha 2011), yang telah diperdagangkan dan dibudidayakan secara turun temurun dalam bentuk perkebunan rakyat di sebagian besar kepulauan Maluku. Produk pala Indonesia termasuk unggul di pasar dunia karena memiliki aroma yang khas dan rendemen minyak yang tinggi (Sjahrul Bustaman). Permasalahan jalur cepat perdagangan pala adalah dengan masuknya para tengkulak di desa yang membuat masyarakat dengan mudah menjual biji pala dengan harga yang lebih rendah. Kualitas pengemasan dan penyimpanan biji sangat berpengaruh pada kualitas biji dan fuli. Pengemasan dan penyimpanan yang baik akan menjaga kualitas biji dan fuli serta menghindari mikotoksin (Desa et al. 2023).

Pada zaman Rhumphius, pengolahan lemak biji pala dilakukan di Kepulauan Banda, Maluku, dan proses tersebut sekarang dilakukan di Eropah dan produknya diperdagangkan sebagai *volatile oil of nutmeg* untuk pembuatan minyak wangi, parfum, sabun, bahan pengolah gula dan makanan. Di Eropah dan Timur Tengah, biji pala diolah menjadi serbuk untuk bumbu masak (Bustaman 2007). Biji pala Banda adalah paling banyak diminati dan agar komoditi tersebut dapat masuk ke pasar ekspor Uni Eropa beberapa regulasi dan persyaratan (*Legal Requirements and Non-Legal Requirements*) harus dipenuhi meliputi keamanan pangan dan pengawasan kesehatan, kontaminan, radiasi, dan keamanan pangan. Beberapa contoh peraturan legal dalam perdagangan pala ke Uni Eropa adalah Dokumen Kualitas Minimal (*The Quality Minimal Document*) yang diterbitkan

oleh *European Spice Association* (ESA). Dokumen ini menjadi pedoman bagi *National Spice Associations* yang berafiliasi dengan ESA (Kemendag RI, 2015: 5). Dalam Peraturan Komisi Eropa (EC) No. 1881/2006 yang diterbitkan pada 19 Desember 2006, disebutkan bahwa tingkat maksimum aflatoksin yang diizinkan dalam pala dan campuran yang mengandung pala adalah antara 5,0 µg / kg (aflatoksin B1) dan 10 µg / kg (total kandunganaq aflatoksin B1, B2, G1 dan G2) (EUR-Lex, 2006). 15 µg / kg (EUR-Lex, 2020). Pada tanggal 1 April 2020, terdapat tambahan peraturan berupa level maksimum Okratoksin A yang terkandung dalam pala yang diijinkan adalah 15 µg / kg (EUR-Lex, 2020). Okratoksin A yang merupakan produk samping dari jamur dari genus *dan*, ditemukan sebagai kontaminan dalam berbagai makanan. Okratoksin A juga ditemukan mempunyai *nephrotoxic*, *teratogenic*, *immunotoxic*, and *carcinogenic* pada beberapa spesies hewan (Pfohl-Leskowicz and Manderville 2007)., *The International Agency for Research on Cancer* (IARC) mengklasifikasikan Okratoksin A sebagai penyebab resiko karsinogenik pada manusia (IARC 1993) (Skarkova et al. 2013).

Tiga metode yang umum digunakan untuk menganalisis aflatoksin dalam makanan, yakni Kromatografi Lapis Tipis Densitometri (KLT Densitometri), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dan EnzymeLinked Immunosorbent Assay/ELISA (Aini 2012). Beberapa metode uji Okratoksin A telah dikembangkan pada beberapa komoditi diantaranya sereal, kopi, cokelat, anggur, bir, dan buah kering (The et al. 2006). Penetapan kadar Okratoksin A umumnya menggunakan metode kombinasi *immunoaffinity clean-up* dengan KCKT *detector fluorescence* (Skarkova et al. 2013). Penerapan metode kombinasi *multitoxin immunoaffinity column cleanup* and *liquid chromatography quantitation* pernah dilaporkan untuk menganalisis kadar aflatoksin B1, B2, G1, G2 dan Okratoksin A dengan pada ginseng dan jahe (Trucksess et al. 2008). Metode analisis aflatoksin dan Okratoksin A secara *Liquid Chromatography* yang dimodifikasi dan divalidasi pada lada hitam, *colorífico*, paprika, dan kunyit (Maryam et al. 2020). Analisis Okratoksin A secara KCKT lainnya yaitu metode uji AOAC ch.49.6.64 (Penetapan kadar okratoksin dalam *barley*) dan metode uji AOAC Ch 49.6.028 (Penetapan kadar Okratoksin A dalam kopi hijau). Metode ini diketahui tidak spesifik untuk biji pala karena spektral Okratoksin A pada sampel uji campuran dengan senyawa referensi (*spiked*) berkonsentrasi tinggi ternyata tidak terdeteksi pada sistem KCKT. Hal ini mungkin dikarenakan pengaruh matriks pada sampel yang diuji sehingga diperlukan validasi metode analisis. Sampai saat ini belum ada metode valid analisis Okratoksin A secara spesifik pada biji pala. Aspek kebaruan dalam penelitian adalah matriks biji pala sebagai target sampel uji diduga terkontaminasi Okratoksin A yang menjadi parameter uji baru dalam persyaratan ekspor ke pasar Uni Eropa. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan pengembangan dan modifikasi metode analisa penetapan kadar Okratoksin A dengan matriks biji pala, menggunakan metode analisis Ochraprep® Biopharm Rhone Ltd. Validasi metode analisis senyawa toksin pada bahan pangan harus memenuhi beberapa kriteria persyaratan. Parameter yang digunakan untuk menyatakan validitas metode analisis adalah selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi (Dhurhanian 2012).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode pengujian Okratoksin A pada biji pala yang valid secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui jumlah kontaminan dari Okratoksin A pada biji pala. Secara praktis metode ini dapat diterapkan secara luas sebagai tahap penting pemenuhan persyaratan standar ekspor luar negeri produk biji pala bebas Okratoksin A.

## 2. Metodologi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pengujian Kimia Pangan Balai Pengawas Obat dan Makanan di Ambon pada Bulan September sampai dengan Oktober tahun 2021.

### 2.1 Bahan dan pereaksi

Okratoksin A (Trilogy USA), NaCl, Tween 20, Asam asetat (Merck, Jerman), Acetonitril, Metanol *grade gradient* untuk KCKT (JT. Backer). PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dibuat dengan melarutkan 8 g NaCl, 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl dalam air 990 mL dan diatur hingga pH 7,4 dan dicukupkan air hingga 1 L.

### 2.2 Alat

HPLC (SHIMADZU CORP. tipe LC-20AD, Japan), *Blixer* (Robot Coupe®5 V.V.), *vacuum manifold* (Waters, USA) dan *Immuno Affinity Column* (IAC) (VICAM-Waters™, USA).

### 2.3 Preparasi Sampel Biji Pala

Sampel berasal dari hasil alam Pulau Seram, Maluku. Preparasi sampel dilakukan mengikuti metode ISO 2825:1981: *Spices and condiments (preparation of a ground sample for analysis)*. Biji pala dihaluskan (*grinding*) menggunakan *blixer* dan disaring menggunakan ayakan *mesh* no.18 untuk mendapatkan sampel dengan ukuran partikel 1 mm.

### 2.4 Ekstraksi dan proses *cleaning*

Sebanyak 25 g sampel ditimbang, ditambahkan 5-gram NaCl dalam gelas piala, kemudian ditambahkan 100 mL metanol 80%, dan dihomogenkan dengan blender selama 2 menit. Sampel disaring menggunakan kertas *Whatman* No. 113 atau No. 4 atau *sentrifugasi* pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 2 mL filtrat diambil dan diencerkan dengan 18 mL (0,1% *Tween* 20 dalam larutan dapar PBS, diatur pH 7,4 menggunakan NaOH 0,2 M. Sebanyak 10 mL filtrat (setara 0,25 g sampel) dialirkan melalui kolom IAC dengan kecepatan alir 2 mL per menit. Pencucian *column* IAC melalui 20 mL PBS dengan kecepatan alir maksimal 5 mL per menit, kemudian dilewatkan udara untuk mengeluarkan sisa cairan. Elusi Okratoksin A dilakukan dengan kecepatan alir 1 tetes per detik menggunakan 1,5 mL metanol asam (asam asetat-metanol, 2:98) pada vial gelas berwarna coklat menggunakan metode *backflushing*. Elusi dilakukan menggunakan 1,5 mL air untuk mendapatkan total volume 3 mL dan disuntikkan ke dalam sistem HPLC, dengan volume injeksi 100 µL.

### 2.5 Preparasi Larutan Standar Okratoksin A

Pembuatan larutan standar Okratoksin A 50.000 ng/mL kemudian dari larutan tersebut dibuat larutan standar *intermediate* konsentrasi 100 ng/mL dan standar seri dengan volume pipet antara 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 mL ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut mendapatkan konsentrasi 0,5-6 µg/mL.

### 2.6 Preparasi *piked sample*

Sampel sebanyak 25 g sampel, ditambah 5 g NaCl ke dalam gelas piala, kemudian ditambahkan 20 mL larutan Baku *Intermediate* Okratoksin A, kemudian didiamkan 30 menit agar toksin berikatan dengan matriks sampel, ditambahkan 80 mL metanol 80 %, dihomogenkan, tahap selanjutnya diperlakukan sama seperti dengan preparasi sampel.

## 2.7 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Larutan sampel, larutan standar, dan larutan *spiked sample* disuntikkan sejumlah 100 $\mu$ L, masing-masing secara terpisah pada sistem HPLC dengan kondisi kolom oktadesilsilane, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4 mm, *fluorescence detector* dengan panjang gelombang eksitasi 333 nm dan emisi 443 nm, laju alir 1 mL/menit. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril-air-asam asetat (51:47:2). Senyawa Okratoksin A dinyatakan terdeteksi dan dapat dihitung kadarnya bila memberikan respon pada waktu retensi yang sama dengan standar.

## 2.8 Validasi Metode

Validasi metode dilakukan dengan penentuan selektivitas (spesifisitas), linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi.

Spesifisitas merupakan kemampuan menguji secara tepat suatu analit dengan adanya komponen lain dan diperkirakan ada sebagai cemaran, hasil degradasi dan matriks sampel. Spesifisitas dilakukan dengan *spiking* zat 2  $\mu$ g dan menunjukkan bahwa hasil pengujian tidak terpengaruh oleh keberadaan matriks sampel.

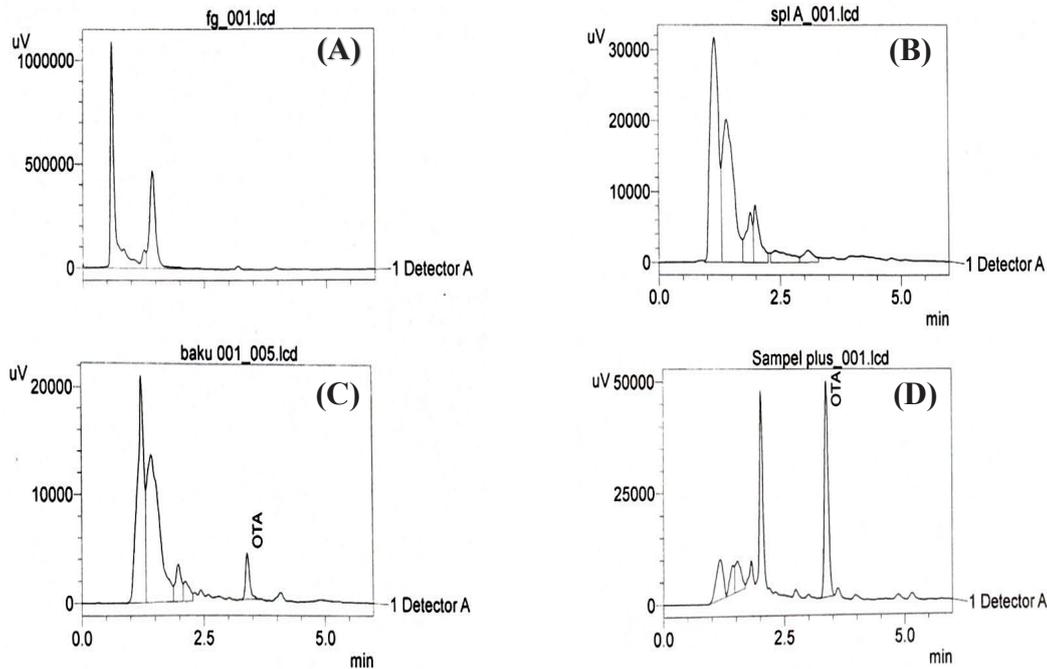
Linieritas dinyatakan dengan nilai koefisien korelasi dari persamaan regresi linier yang diberikan dari area kurva standar seri, dilakukan untuk mengetahui linieritas hubungan antara konsentrasi okratoksin A terhadap respon. Akurasi berupa persentase perolehan kembali dengan penetapan jumlah analit tambahan yang diketahui dalam sampel, dengan cara menambahkan Okratoksin A sebanyak 2  $\mu$ g ke dalam 25 g sampel dan diperlakukan seperti perlakuan sampel dan dihitung perolehan kembali.

Presisi berupa kedekatan hasil analisis satu dengan hasil analisis lain dari suatu seri pengukuran yang berulang-ulang pada saat penetapan kadar. Menetapkan sejumlah sampel homogen untuk menghitung perkiraan standar deviasi yang valid secara statistik atau standar deviasi *relative*, dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah Okratoksin A 2 mg ke dalam 25 g sampel dan diperlakukan seperti perlakuan sampel, dengan beberapa kali pengulangan. Data pelarut dan data sampel/matriks blanko dibandingkan, spesifik bila larutan pelarut dan blanko tidak memberikan respon yang sama dengan standar atau *spiked* sampel.

Batas deteksi dan batas kuantitasi berupa karakteristik dari batas pengujian dan merupakan jumlah analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi dan dapat dikuantitasi. Batas deteksi dilakukan dengan penambahan sejumlah analit hingga mengandung 0.397 sampai dengan 23,85 ng/g dan diperlakukan seperti sampel area.

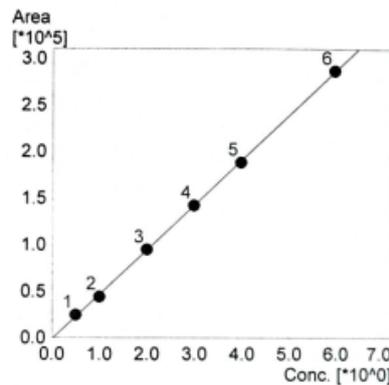
## 3. Hasil dan Pembahasan

*Screening* awal dilakukan dengan uji kesesuaian sistem, dengan menyuntikkan larutan standar beberapa kali sehingga diperoleh RSD respon waktu retensi dan area standar  $\leq 2.0\%$ . Sampel disuntikkan ke dalam sistem HPLC, hasil yang diperoleh tidak menunjukkan respon yang sama dengan standar. Sampel dianggap sebagai blanko matriks. Pada uji selektivitas diketahui bahwa data kromatogram pelarut dan data sampel/matriks blanko menunjukkan hasil yang spesifik. matriks biji pala tidak mempengaruhi hasil uji, tidak memberikan respon yang sama dengan baku atau *spiked* sampel. Hasil analisis memiliki selektivitas dan spesifitas yang baik dan spesifik.



**Gambar 1.** (A) Kromatogram pelarut tidak memberikan respon yang sama dengan standar; (B) Kromatogram sampel biji pala sebagai matriks yang tidak memberikan respon yang sama dengan standar; (C) Kromatogram standar Okratoksin A: memberikan respon pada waktu retensi 3,4 menit; (D) Kromatogram spiked sample: memberikan respon pada waktu retensi yang sama dengan baku.

Pada uji linearitas, hubungan antara peningkatan konsentrasi analit area 0,5 – 6,0 ng/ml terhadap luas area yang muncul pada KCKT menunjukkan respon linear dengan  $r$  (factor korelasi) 0,9998 dan nilai  $Vx0=1,40\%$ . Dapat disimpulkan bahwa metode HPLC memiliki linieritas yang baik



**Gambar 2.** Kromatogram kurva kalibrasi standar Okratoksin A

Dalam uji akurasi diperoleh hasil analisis dengan nilai perolehan kembali sebesar 84, 86, 85, 86, 86, 87 % namun masih dilakukan pada konsentrasi 78,17  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dengan konsentrasi yang sama. Penelitian selanjutnya, perlu dilakukan dalam 3 konsentrasi yang berbeda untuk melihat pola perolehan kembali.

Kepresisian analisis ditunjukkan dengan nilai RSD 2.02% dengan syarat berdasarkan CV Horwitz yaitu  $\leq 8.03\%$ , merupakan kedekatan hasil analisis satu dengan hasil analisis lain dari suatu

seri pengukuran yang berulang-ulang pada saat penetapan kadar. Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis memiliki presisi yang baik. Pada penelitian ini dilakukan dengan keberagaman hasil analisis pada sampel, alat, personil, dan waktu yang sama (*repeatability*). Untuk mendapatkan tingkat presisi yang lebih baik perlu dilakukan pengulangan untuk melihat keberagaman hasil pengujian terhadap sampel yang sama dan analisis serta peralatan yang berbeda pada dua atau lebih laboratorium (*reproducibility*).

Batas deteksi analisis diketahui pada kadar 1,59 µg/kg (ppb) menunjukkan metode masih dapat mendeteksi pada kadar tersebut dan masih berada di bawah kadar persyaratan yaitu 15 µg/kg. Penentuan dilakukan dengan *spiked sampel* hingga kadar 0,39; 0,79; 1,59; 9,79 µg/kg, dan diperoleh batas deteksi pada kadar 1,59 µg/kg. Sementara batas kuantitasi hasil analisis diperoleh pada kadar 5,82 µg/kg (ppb) menunjukkan metode dapat mengukur pada kadar tersebut (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil validasi metode analisis kadar okratoksin A pada biji pala.

Parameter validasi	Hasil validasi			Kesimpulan
	Nilai	Syarat	Satuan	
Spesifisitas	Spesifik*	Spesifik*	-	Memenuhi
Linieritas	0,9998	≥0,995	-	Memenuhi
Presisi RSD	2.02	≤ 8.03	%	Memenuhi
Akurasi	84-87	60-115	%	Memenuhi
Limit deteksi	1,59	-	µg/kg	-
Limit kuantitasi	5,82	-	µg/kg	-

\*Spesifik : Larutan blanko sampel tidak memberikan respon seperti pada larutan baku dan sampel *spike*.

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa metode ini memenuhi persyaratan pada validasi dan dapat digunakan untuk menganalisis kadar okratoksin A pada biji pala. Pada penelitian analisis kadar okratoksin A selanjutnya perlu dilakukan presisi dan akurasi pada matriks biji pala dengan konsentrasi yang lebih rendah dan dilakukan uji *reproducibility*.

#### Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih kepada fasilitator dan pembimbing dari Badan Riset dan Inovasi Nasional (Bapak Achmad Dinoto, Ph.D.) atas bantuannya dalam penyiapan naskah ini pada diklat penulisan karya tulis ilmiah batch 3 Badan POM tahun 2022. Terima kasih juga disampaikan kepada Balai Pengawas Obat dan Makanan di Ambon sebagai fasilitator sehingga karya tulis ilmiah ini dapat selesai dilaksanakan.

## Daftar Referensi

- Aini, Nurul. 2012. "Aflatoxin: Cemaran Dan Metode Analisisnya Dalam Makanan." *Jurnal Kefarmasian Indonesia* 2(2):54–61.
- Bustaman, Sjahrul. 2007. "Prospek Dan Strategi Pengembangan Pala Di Maluku." *Prospek Dan Strategi Pengembangan Pala Di Maluku* 6(2):68–74.
- Desa, D. I., Hila Kecamatan, Leitimur Selatan, Maluku Tengah, Program Studi, Teknologi Hasil, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, and Ambon Jl. 2023. "Penyuluhan Proses Pasca Panen Pala Kepada Petani Pala Counseling On The Post Harvest Process Of Nutmeg To Nutmeg Farmers In Hila Village , Leitimur South Sub- District , Central Maluku District , Maluku." 3(1):36–43.
- Dhurhania. 2012. "Penetapan Kadar Metilparaben Dan Propilparaben Dalam Hand and Body Lotion Secara High Performance Liquid Chromatography Determination of Methylparaben and Propylparaben in Hand and Body Lotion by High Performance Liquid." 1(1):38–47.
- Iha, M. H., Rodrigues, M. L., & Trucksess, M. W. (2021). Multitoxin immunoaffinity analysis of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Journal of Food Safety*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/jfs.12921>
- Kesehatan Republik Indonesia, 2020, Farmakope Indonesia Edisi VI, Jakarta
- Mair, C., Norris, M., Donnelly, C., Leeman, D., Brown, P., Marley, E., Milligan, C., & Mackay, N. (2021). Assessment of citrinin in spices and infant cereals using immunoaffinity column clean-up with hplc-fluorescence detection. *Toxins* 13(10),
- Maryam, R., P. M. Widiyanti, F. Ramadhani, and H. Munawar. 2020. "Homogenitas Dan Stabilitas Kit ELISA OTA, Serta Aplikasinya Untuk Mendeteksi Ochratoxin A Pada Pakan Unggas (Homogeneity and Stability of OTA ELISA Kit and Its Application for Ochratoxin A Detection in Poultry Feed)." *Pros.Semnas.TPV* 664–76.
- Skarkova, Jarmila, Vladimir Ostry, Frantisek Malir, and Tomas Roubal. 2013. "Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography." *Analytical Letters* 46(10):1495–1504. doi: 10.1080/00032719.2013.771266.
- Thangaselvabai, T., and K. R. Sudha. 2011. "Nutmeg ( Myristica Fragrans Houtt ) – the Twin Spice – a Review." 32(4):283–93.
- The, Pinion O. F., Anel On, Ontaminants I. N. The, Hain On, A. Request From, T. H. E. Commission, Related To, and I. N. Food. 2006. "O s p c f c A." 1–56.
- Trucksess, Mary W., Carol M. Weaver, Carolyn J. Oles, Frederick S. Fry, Gregory O. Noonan, Joseph M. Betz, Jeanne I. Rader, L. Carter, L. C. Chiueh, J. Dorner, M. Drifted, D. Hengst, N. Henry, Q. Hu, M. Hurley, M. Iha, B. Kellher, K. Kroeger, B. Lei, S. MacDonald, H. Mai, B. Malone, J. Maurer, and L. Phawanat. 2008. "Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin a in Ginseng and Ginger by Multitoxin Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatographic Quantitation: Collaborative Study." *Journal of AOAC International* 91(3):511–23. doi: 10.1093/jaoac/91.3.511.
- Wahyuni, S. 2016. *Pemuliaan Pala: Sejarah, Sosial Ekonomi, dan Prospek. Pengembangan*. Penerbit IAARD Press, p. 50-57
- William, H., Jr George W.L., 2005. *Official Methods of Analysis, 18 th edition*. USA. AOAC International. Ch.49 p 58-68.