

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sterilisasi Kacang Tanah

Proses sterilisasi bertujuan untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan. Konsentrasi natrium hipoklorit (NaOCl) pada tahap sterilisasi kacang tanah mempengaruhi pertumbuhan kecambah kacang tanah, konsentrasi NaOCl 3% dan 5% tidak lebih baik dari NaOCl 1% (**Gambar 4.1**). Pada konsentrasi NaOCl 1% juga tidak tumbuh jamur yang dapat mempengaruhi kadar OTA sehingga NaOCl 1% digunakan sebagai sterilisasi kacang tanah. Penggunaan NaOCl sebagai sterilisasi kacang tanah dikarenakan NaOCl sering digunakan sebagai disinfektan atau zat pemutih, yang melepaskan gas oksigen sebagai produk sampingan dan sangat efektif melawan semua jenis bakteri, jamur, dan virus, dengan mengoksidasi molekul biologis seperti protein dan asam nukleat (Bewley & Black, 1994). Namun kemampuan mengoksidasi protein tersebut juga dapat memberi dampak buruk pada perkecambahan jika berlebih NaOCl. Protein adalah sumber energi utama pada perkecambahan sebagai sumber untuk pertumbuhan tanaman (Mora-escobedo & Castro-rosas, 2019). Sehingga adanya NaOCl dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat terjadinya pertumbuhan dalam proses perkecambahan.



Gambar 4.1 Optimasi konsentrasi NaOCl perkecambahan kacang tanah (a) NaOCl 1% (b) NaOCl 3% (c) NaOCl 5%.

4.2 Proses Perkecambahan

Perkecambahan merupakan suatu proses pertumbuhan tanaman untuk menambah generasi selanjutnya. Perkecambahan dimulai dengan imbibisi biji kering dan diakhiri dengan penonjolan radikula (Bewley, 1997; Bewley dkk., 2013). Kacang tanah yang telah dipanen akan mengalami kekeringan. Untuk bertahan dari kekeringan, kacang tanah akan mengalami pengambilan air atau

imbibisi. Sebelum proses perkecambahan diperlukan imbibisi agar metabolisme pada kacang tanah dapat teraktivasi kembali. Imbibisi dilakukan dengan merendam kacang tanah dengan air.

Pada penelitian ini, imbibisi dilakukan dengan menambahkan larutan OTA dengan tujuan *spiking* OTA. Karena OTA bersifat tidak larut dalam air sehingga diperlukan penambahan pelarut organik yang dapat melarutkan OTA. Hal yang penting dalam perkecambahan ini adalah pertumbuhan kacang, banyaknya pertimbangan ini maka dilakukan optimasi pelarut (jenis dan konsentrasi) dan metode *spiking* OTA.

Optimasi pelarut organik dilakukan dengan mencampur metanol:air pada konsentrasi 4% dan 10 % (Mehrafarin dkk., 2011) dan asetonitril: air dalam asam asetat dengan konsentrasi asetonitril 10% dan 39 % (Oguz & Bozoglu, 2022; Pakfetrat dkk., 2019; Vita dkk., 2014). Berdasarkan hasil pertumbuhan kacang tanah dilihat dari persentase perkecambahan diketahui bahwa metanol:air 4%, metanol: air 10 %, asetonitril:air 10% dalam asam asetat, dan asetonitril:air 39% dalam asam asetat secara berurutan memiliki persentase perkecambahan 69; 60; 92,8; dan 6,6%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi pelarut organik yang tinggi dapat mengakibatkan penghambatan pertumbuhan kacang tanah. Hal ini berbanding lurus dengan penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi pelarut organik yang tinggi dapat berpotensi sebagai stres pada kacang tanah (Han & Yang, 2015), sehingga memungkinkan terjadinya kerusakan dan kematian (Mehrafarin dkk., 2011).

Jenis pelarut juga mempengaruhi penghambatan terhadap pertumbuhan kacang tanah. Metanol dapat menghambat perkecambahan diduga karena metanol memiliki kemampuan untuk mendenaturasi protein sehingga protein yang seharusnya menjadi sumber energi ketika perkecambahan sehingga kecambah tidak tumbuh dengan baik (Dubois dkk., 2013). Walaupun asetonitril memiliki sifat toksik yang lebih tinggi dari metanol, pada pelarut ini ditambahkan asam asetat yang dapat meningkatkan keasaman. Hal ini mendukung pertumbuhan kacang tanah yang optimal pada pH 5,8 - 6,2 (Balota & Specialist, 2014). Sehingga berdasarkan pertumbuhannya asetonitril:air 10% dalam suasana asam lebih baik untuk dijadikan pelarut *spiking* OTA.

Selain berdasarkan pertumbuhan, kelarutan OTA juga menjadi pertimbangan dalam pemilihan pelarut. OTA larut dalam pelarut organik begitupun dalam asetonitril maupun metanol. Namun, OTA lebih baik larut dalam suasana asam (el Khoury & Atoui, 2010). Sehingga pelarut asetonitril:air 10% dalam suasana asam dengan asam asetat lebih baik dibandingkan dengan metanol:air.

Tahap *spiking* OTA memiliki tujuan menambahkan OTA dalam kacang tanah, agar penurunan OTA dapat terlihat dengan baik. Sehingga optimasi metode *spiking* juga dilakukan. Optimasi metode *spiking* dilakukan dengan dua metode yaitu dengan metode *spray* dan *soaking* selama 24 jam menggunakan larutan OTA 0,1 ppm. Metode *spiking* dengan *soaking* dilakukan pada kacang tanah yang sudah disterilisasi dengan melakukan perendaman menggunakan larutan OTA 0,1 ppm selama 24 jam dibantu dengan *shaker* dalam kondisi gelap. Sedangkan metode *spray* dilakukan pada kacang tanah yang sudah disterilisasi dan direndam menggunakan air steril selama 24 jam, kemudian dilakukan penyemprotan menggunakan *sprayer* larutan OTA 0,1 ppm sebanyak 1 : 1 (m/v). Selanjutnya kacang-kacang tersebut dilakukan perkecambahan menggunakan *germinator* selama 4 hari. Setelah proses germinasi sampel dilakukan pengeringan menggunakan *oven*, dihaluskan, diayak, dan diekstraksi. Ekstrak sampel dianalisis menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS sehingga dihasilkan luas area OTA yang sebanding dengan konsentrasinya (**Tabel 4.1**).

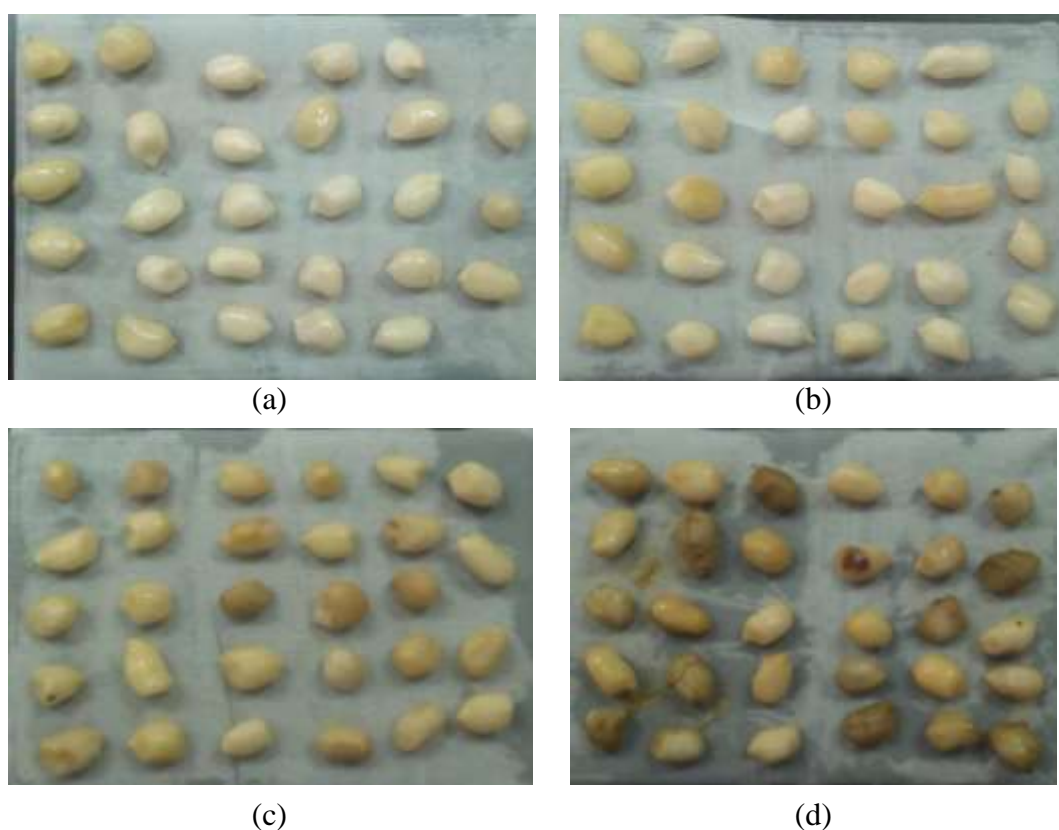
Hasil analisis UHPLC-ESI-MS/MS menunjukkan bahwa luas area metode *spiking* dengan *soaking* memiliki luas area lebih banyak, yang artinya jumlah OTA yang terserap lebih banyak daripada metode *spray*, karena pada penelitian ini harapannya kacang tanah dapat menyerap OTA sebanyak mungkin. Oleh karena itu metode *soaking* lebih baik daripada metode *spray*.

Tabel 4.1 Luas area kromatogram optimasi metode *spiking*

Sampel	Luas Area Kromatogram
Metode <i>Spray</i>	2116
Metode <i>Soaking</i>	3715

Perkecambahan memerlukan waktu yang lama sehingga diperlukan optimasi agar dapat mengefektifkan waktu dan bahan yang ada. Optimasi lama perkecambahan dilakukan pada kacang tanah yang sudah diberi OTA dengan

mempertimbangkan pertumbuhan kacang tanah dan jamur. Setelah dilakukan optimasi ternyata didapatkan pada hari ke 4 kacang tanah mengalami perubahan warna menjadi hitam, muncul jamur, dan kacang tanah menjadi berlendir (**Gambar 4.2**). Hal ini menunjukkan kacang tanah yang telah dilakukan *spiking* OTA 100 ppb dapat hidup dengan baik saat proses perkecambahan hingga 3 hari. Sehingga lama perkecambahan yang optimal yaitu pada hari ke 3. Hal ini juga didukung penelitian sebelumnya bahwa pada hari ke 3 perkecambahan OTA mengalami penurunan yang signifikan, sedangkan pada hari-hari selanjutnya tidak berbeda signifikan (Pakfetrat dkk., 2019).



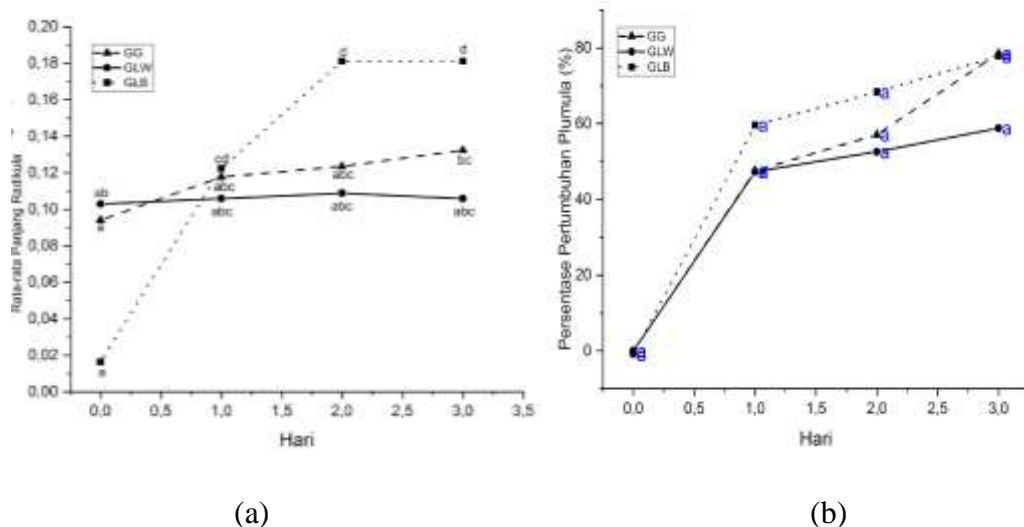
Gambar 4.2Optimasi Lama Perkecambahan (a) Hari 1, (b) Hari 2, (c) Hari 3, (d) Hari 4

Setelah mendapatkan lama perkecambahan yang optimal. Kacang tanah yang telah mengandung OTA dikecambahkan selama 3 hari menggunakan germinator pada RH 100% dan suhu 25°C. Perkecambahan dilakukan pada 3 perlakuan yaitu perkecambahan gelap, perkecambahan *blue light* dan perkecambahan *white light*. Lampu yang digunakan pada penelitian ini yaitu merupakan lampu *Fluorescent Tube*, 8 W dengan warna putih dan biru. Pemilihan

lampu dengan daya 8 W, karena daya berbanding lurus dengan intensitas, intensitas dapat mempengaruhi pertumbuhan perkecambahan, semakin tinggi intensitas lampu maka perkecambahan akan semakin terhambat (Veloso dkk., 2017). Selain pertumbuhan pada perkecambahan, hal yang diperhatikan juga pengaruh intensitas terhadap penurunan OTA. Sehingga digunakan dengan intensitas tersebut karena pada intensitas tersebut merupakan intensitas yang optimal untuk melakukan perkecambahan dan dapat mengurangi OTA (Schmidt-Heydt dkk., 2011a).

OTA dapat mengalami degradasi ketika diberi perlakuan cahaya (Schmidt-Heydt dkk., 2012). Hal ini dikarenakan OTA merupakan senyawa yang dapat menyerap suatu energi cahaya UV dan tampak (*Visible*) yang disebabkan adanya gugus kromofor pada strukturnya. Standar OTA memiliki panjang gelombang maksimum pada 310-455 nm (Bonvehí, 2004; Ghali dkk., 2009; Schmidt-Heydt dkk., 2012). Panjang gelombang tersebut meliputi sinar UV dan Vis terutama lampu biru yang memiliki panjang gelombang 450 – 485 nm (Coats dkk., 2021), maka dari itu digunakan lampu biru pada analisis ini. Sedangkan pemilihan lampu putih didasari oleh rentang panjang gelombang yang besar yaitu pada 380 – 700 nm (Singh & Mishra, 2015), hingga diharapkan dapat menurunkan kadar OTA dengan baik.

Fase III dari perkecambahan adalah tumbuhnya radikula dan plumula yang menjadikan parameter pertumbuhan kacang tanah (Rajjou dkk., 2006). Radikula merupakan akar embrionik primer yang berfungsi untuk meningkatkan penyerapan air untuk kebutuhan perkecambahan. Sedangkan plumula merupakan daun embrionik primer (Gilbert, 2000). Parameter pertumbuhan meningkat saat proses perkecambahan kacang tanah. Paparan *Blue light* saat perkecambahan mendukung proses perkecambahan dilihat dari parameter pertumbuhan. Hal ini bertentangan dengan paparan *White light* yang dapat menghambat pertumbuhan kecambah (**Gambar 4.3**).

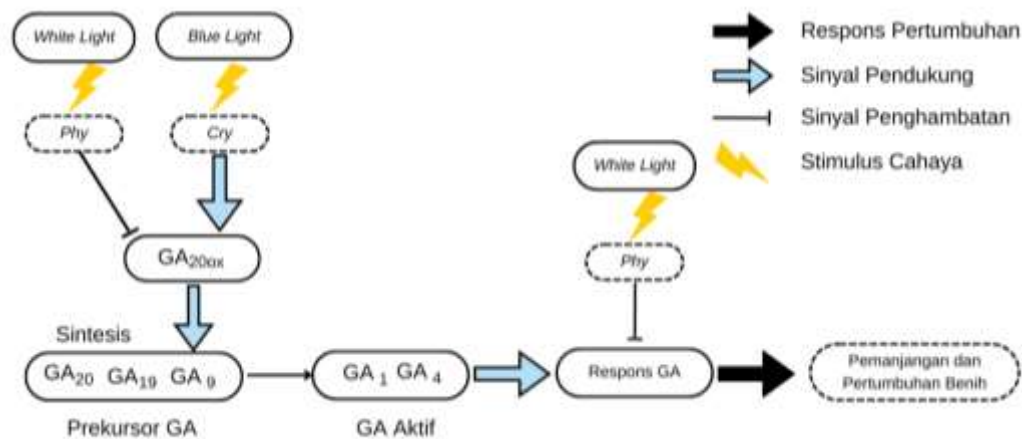


Gambar 4.3 Parameter Pertumbuhan kecambah kacang tanah selama perkecambahan cahaya a) panjang radikula b) jumlah plumula

Pengaruh cahaya tersebut diduga disebabkan oleh fitohormon. Hormon tersebut dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Asam giberelat (GA) dan asam absisat (ABA) merupakan fitohormon yang berkorelasi dengan perkecambahan. ABA adalah pengatur negatif utama perkecambahan biji, bertanggung jawab untuk induksi dan pemeliharaan dormansi, sedangkan GA memiliki efek antagonis terhadapnya, karena mendorong perkecambahan (Oracz dkk., 2016). Cahaya dapat menginduksi hormon tersebut yang dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Perkecambahan *White light* terbukti memiliki kadar ABA lebih banyak dibanding dengan perkecambahan gelap, yaitu sebesar 2,2 ng per embrio sedangkan pada gelap hanya 1,1 ng per embrio (Jacobsen dkk., 2013). Sehingga perkecambahan dalam paparan *White light* dapat terhambat dikarenakan fungsi penghambatan perkecambahan dari ABA. Sedangkan *Blue light* terbukti dapat meningkatkan produksi GA (Fukuda & Terao, 2015). Sehingga perkecambahan dalam paparan *Blue light* dapat meningkat dikarenakan fungsi pendorong perkecambahan oleh GA.

Perbedaan ini dikarenakan lampu biru dengan panjang gelombang 450 nm akan diserap oleh suatu reseptor yaitu gen yang dikenal sebagai *cryptochromes* (Cry) (420 nm) yang terlibat dalam pemanjangan hipokotil, tangkai daun, dan perkecambahan biji dengan mendukung suatu gen GA_{20ox} yang dapat meningkatkan sintesis GA (Fukuda & Terao, 2015). Sedangkan *white light* akan diterima oleh

PhyE (*Phytohormone E*) yang dapat menghambat perkecambahan biji dengan menghambat ekspresi GA_{20ox} yang berujung dengan penghambatan sintesis hormon GA (Hennig dkk., 2002) (**Gambar 4.4**).



Gambar 4.4 Mekanisme pengaruh lampu terhadap perkecambahan diadaptasi dari Fukuda & Terao (2015).

4.4 Ekstraksi OTA pada Kecambah Kacang Tanah

Senyawa OTA pada sampel diekstraksi menggunakan pelarut asetonitril:air:asam asetat (84:15:1). Hasil ekstraksi didapatkan ekstrak OTA pada sampel kecambah kacang tanah sebanyak 2 mL. Pemilihan pelarut ini berdasarkan optimasi yang sudah dilakukan oleh (Wang dkk., 2020), yaitu dengan membandingkan beberapa pelarut diantaranya metanol:air (84:16), metanol:air:asam asetat (84:15:1), asetonitril:air (84:16), dan asetonitril:air:asam asetat (84:15:1). Hasil optimasi tersebut menunjukkan bahwa pelarut yang paling baik dalam memisahkan OTA yaitu pelarut asetonitril:air:asam asetat (84:15:1) dengan kemampuan *recovery* OTA > 80%. OTA memiliki kelarutan baik dalam asetonitril dibanding dengan metanol karena polaritas yang tinggi pada asetonitril (Rubert dkk., 2010). Adanya asam pada pelarut dapat melarutkan OTA dengan baik karena OTA merupakan asam organik lemah (el Khoury & Atoui, 2010).

Kecambah kacang tanah dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam dengan tujuan untuk menghentikan metabolisme yang terjadi pada kacang. Kecambah kacang tanah yang kering kemudian dilakukan penghalusan dengan tujuan memperluas permukaan sehingga akan berinteraksi dengan pelarut semakin optimal. Serbuk kecambah kacang tanah yang diperoleh,

kemudian dilakukan penyaringan, dengan tujuan menyamakan ukuran sampel sehingga hasil yang terekstrak antara satu sampel dengan sampel lainnya seragam. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *shaker* selama 1 jam hal ini bertujuan untuk meningkatkan jumlah OTA yang larut dalam pelarut. Setelah dilakukan *shaker* sampel disentrifugasi untuk memisahkan padatan dan larutan OTA. Ekstraksi dilakukan sebanyak dua kali pengulangan untuk meningkatkan hasil OTA yang terekstrak.

4.5 Analisis OTA menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS

Analisis UHPLC-ESI-MS/MS bertujuan untuk mengidentifikasi adanya OTA pada setiap sampel dan mengetahui penurunan OTA karena adanya *treatment*. UHPLC-ESI-MS/MS yang digunakan pada penelitian ini menggunakan sumber ion *electrospray ionization* (ESI) dan analyzer *Triple Quadrupole*. Analisis menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS diawali dengan optimasi parameter UHPLC-ESI-MS/MS. Optimasi parameter UHPLC-ESI-MS/MS dilakukan dengan menganalisis larutan standar OTA. Optimasi dilakukan dengan menggunakan metode *full scan/precursor ion scanning*. Metode *precursor ion scanning* adalah metode yang digunakan untuk melakukan *scanning* terhadap ion yang diinginkan dengan melihat m/z yang muncul dibandingkan dengan m/z senyawa yang diinginkan tersebut (Harmita dkk., 2019).

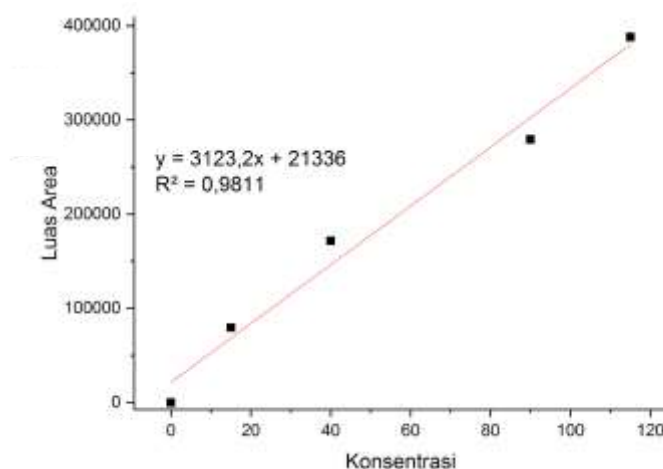
Pada uji parameter UHPLC-ESI-MS/MS ini dilakukan dengan melihat m/z OTA yaitu sebesar 404 (Ouakhssase dkk., 2021). Setelah ion prekursor ditemukan yaitu pada 404,10 pada waktu retensi 2,550 menit, kemudian dicari ion produknya untuk membuktikan kebenaran senyawa OTA menggunakan metode *Product Ion Scan* (PIS), ESI positif pada *collision energy* (CE) -24,-15, dan -39 selama 8,010 menit, *dwell time* 100. *Product Ion Scan* (PIS) merupakan metode untuk melakukan *scanning* ion produk dari ion prekursor yang telah ditentukan kemudian dibandingkan dengan teori untuk mengetahui kebenarannya (Harmita dkk., 2019). Hasil PIS diketahui terdapat produk dari ion prekursor tersebut pada m/z 238,85(Q:*Quantification product ion*); m/z 358,00 (q: *confirmation product ion*); dan m/z 221,00 (q).

Pada penelitian ini, elusi yang digunakan yaitu asam format 0,1% baik dalam air maupun dalam asetonitril. Elusi dilakukan secara gradien dengan tujuan

meningkatkan hasil pemisahan senyawa yang terbaik. Pemilihan eluen juga didasarkan pada kelarutan OTA yang larut baik dalam asetonitril juga asam (Rubert dkk., 2010; Wang dkk., 2020).

4.5.1 Analisis Penurunan OTA menggunakan UHPLC-ESI-QQQ

Analisis kuantitatif OTA menggunakan UHPLC-ESI-MS/MS dengan untuk menganalisis penurunan OTA pada perkecambahan cahaya dengan menggunakan kurva standar. Kurva standar dievaluasi menggunakan beberapa konsentrasi standar OTA yaitu pada 0, 15, 40, 90, 115 ppb. Pemilihan konsentrasi standar tersebut dikarenakan hasil S/N ketika analisis MRM untuk standar yaitu sekitar 5 ppb. Standar dibuat menggunakan pengenceran larutan OTA 50 ppm menggunakan pelarut asetonitril:air:asam asetat (84:15:1). Pemilihan pelarut tersebut berdasarkan kelarutan OTA pada asetonitril dan asam (Rubert dkk., 2010; Wang dkk., 2020). Berdasarkan hasil analisis didapatkan kurva standar dengan persamaan regresi $y = 3123,2x + 21366$ dengan koefisien relasi 0,9811 **Gambar 4.5**. Koefisien korelasi ini menunjukkan tingkat akurasi yang cukup pada proses respon terhadap mikotoksin yaitu $> 0,980$ (Chuaysrinule dkk., 2020).



Gambar 4.5 Kurva kalibrasi standar OTA

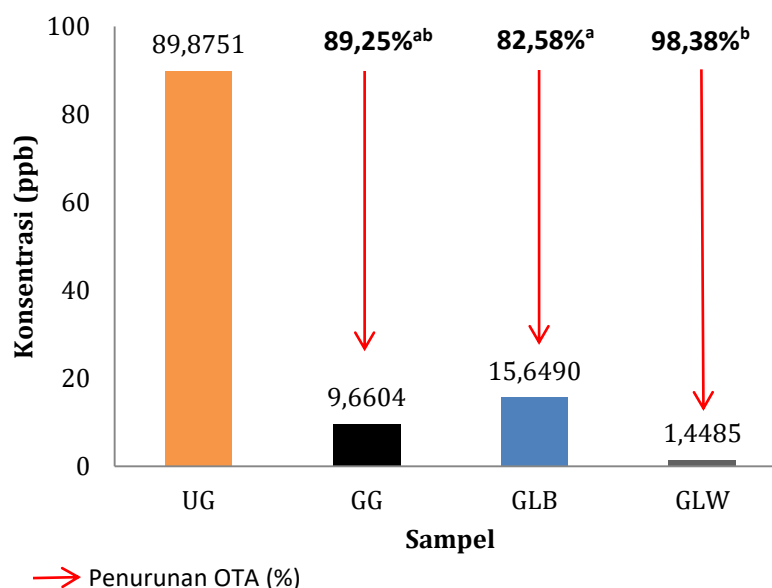
Metode analisis UHPLC-ESI-MS/MS yang digunakan untuk menganalisis penurunan OTA yaitu metode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) yang merupakan metode analisis dengan memilih nilai m/z ion prekursor yang spesifik pada kedua penganalisis massa dan ruang tumbukan diisi dengan gas penumbuk. (Harmita dkk., 2019). Pemilihan metode ini dikarenakan metode ini memiliki

kespesifikan dan sensitivitas yang tinggi, sehingga cocok dengan analisis OTA dalam konsentrasi rendah.

Kurva standar yang didapatkan sebelumnya digunakan untuk menentukan konsentrasi dalam sampel kecambah kacang tanah, didapatkan dari 100 ppb OTA yang *spike*, terdapat 89,87 ppb OTA yang terserap kacang tanah. Selain itu didapatkan juga konsentrasi pada sampel kecambah kacang tanah yang telah diberi perlakuan perkecambahan gelap sebanyak 9,66 ppb, perkecambahan dengan *blue light* sebanyak 15,65 ppb dan perkecambahan *white light* sebanyak 1,45 ppb. Berdasarkan konsentrasi OTA yang terdeteksi tersebut didapatkan bahwa perkecambahan memiliki dampak penurunan OTA pada kacang tanah (**Gambar 4.6**). Perkecambahan gelap dapat menurunkan OTA sebanyak 89,25%. Selama proses perkecambahan, berbagai macam enzim ikut serta dalam siklus metabolisme. Salah satu enzim yang banyak berperan yaitu protease. Enzim protease dapat dikatalogkan dalam: endopeptidase, aminopeptidase, dan karboksipeptidase, yang bertanggung jawab untuk mobilisasi cadangan protein (Mora-escobedo & Castro-rosas, 2019). Adanya peptidase pada proses perkecambahan ini juga menjadi salah satu faktor penyebab kadar OTA menurun. OTA akan mengalami degradasi ketika terdapat enzim karboksipeptidase menjadi $OT\alpha$. Pembentukan $OT\alpha$ dianggap sebagai jalur detoksifikasi penting OTA. Meskipun sebagian diserap dari usus, $OT\alpha$ tidak menumpuk di ginjal tetapi dengan cepat diekskresikan bersama urin, juga sebagai glukuronida. Pada manusia, $OT\alpha$ -glukuronida adalah metabolit urin utama.

Pemberian perlakuan cahaya dalam perkecambahan juga mempengaruhi penurunan OTA. *White light* dapat menurunkan kadar OTA lebih banyak daripada perkecambahan gelap yaitu sebanyak 98,39% dan *blue light* yang bahkan mengurangi kemampuan menurunkan OTA 82,59%. Hal ini dimungkinkan pada perkecambahan dengan perlakuan *white light*, cahaya berperan sebagai stres karena kacang tanah mengalami penghambatan pertumbuhan sehingga dapat memunculkan fitoaleksin yang dapat membantu mendegradasi OTA (Cai dkk., 2022). Sedangkan pada perkecambahan dengan perlakuan *blue light*, perkecambahan meningkat dibanding tanpa cahaya. Hal ini menyebabkan

penggunaan enzim untuk menurunkan OTA cenderung digunakan untuk melakukan pertumbuhan daripada menurunkan OTA.



Gambar 4.6 Konsentrasi dan penurunan OTA pada perkecambahan (UG: *Ungermination*, GG: Germinasi Gelap, GLB : Germinasi *Light Blue*, GLW: Germinasi *Light White*)

4.5.2 Analisis Produk Modifikasi OTA selama perkecambahan cahaya

Reaksi biologi atau kimia selama proses perkecambahan dimungkinkan dapat merubah struktur OTA yang diduga dapat menyebabkan penurunan OTA dalam kecambah kacang tanah, karena tidak terdeteksinya OTA saat analisis dalam bentuk prekursoranya. Oleh karena itu, analisi senyawa turunan OTA pada sampel dilakukan untuk mengetahui senyawa turunan apa saja yang dihasilkan serta untuk mengetahui produk modifikasi OTA. Analisis UHPLC-ESI-QQQ menggunakan metode PIS dilakukan untuk mengkarakterisasi produk perubahan OTA yang dihasilkan oleh *treatment* pada kacang tanah.

Analisis dilakukan menggunakan metode PIS dengan menganalisis produk ion dari beberapa senyawa turunan OTA yang diduga muncul dikarenakan perlakuan perkecambahan dengan cahaya. Percobaan ini dilakukan dengan menganalisis spektra MS2 pada rentang m/z 100-1000 pada ESI (+) dengan tujuan untuk dapat scanning semua produk degradasi yang dimungkinkan terbentuk. Pada metode ini m/z produk perubahan OTA yang memungkinkan dilakukan analisis, kemudian hasil fragmentasi dibandingkan dengan pola fragmentasi dari senyawa turunan OTA tersebut dengan sumber yang sudah dilakukan penelitian sebelumnya.

Azizah Nurdiana, 2023

PENGARUH KONDISI PERKECAMBAHAN TERHADAP PENURUNAN DAN PRODUK MODIFIKASI OKRATOKSIN A PADA KACANG TANAH

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

Kriteria deteksi MS, senyawa dapat terdeteksi dengan dua m/z fragmen dilihat dari transisi m/z fragmen kuantifikasi dan konfirmasi (Ouakhsase dkk., 2020). Produk yang diduga modifikasi OTA diantaranya OTB, OTC, OT β , dan OTA Glukosa Ester.

Pemilihan produk-produk ini didasari oleh kelompok okratoksin yaitu OTB dan OTC. OTB diduga dihasilkan karena adanya penambahan cahaya yang dapat memutus ikatan kovalen pada C – X dengan membentuk spesi radikal (Huang dkk., 2022). Sehingga OTB dijadikan dugaan produk modifikasi OTA yang terbentuk pada percobaan ini.

Selain itu terbentuk OT β dari OTB yang mengalami hidrolisis yang disebabkan oleh adanya air dan dipercepat dengan enzim hidrolase khususnya karboksipeptidase (Tavano, 2013). Enzim ini akan memutus ikatan peptida yang berdekatan dengan gugus karboksilat atau posisi α pada gugus –COOH (Auld, 2013). Hal tersebut sesuai dengan ikatan peptida pada OTB, dimana enzim karboksipeptidase juga mengalami peningkatan pada proses perkecambahan, yang bertanggung jawab untuk mobilisasi cadangan protein (Mora-escobedo & Castro-rosas, 2019). Sehingga OT β menjadi produk yang diduga turunan OTA yang disebabkan oleh perkecambahan cahaya.

Selain itu produk modifikasi yang diduga turunan OTA yaitu OTC. OTC terbentuk dengan penambahan gugus etil ester pada OTA khususnya pada gugus karboksi. Penambahan gugus etil ester pada gugus karboksi ini disebabkan oleh reaksi esterifikasi. Reaksi esterifikasi ini dapat disebabkan oleh enzim karboksierase yang mengalami peningkatan aktivitas ketika perkecambahan (Qin dkk., 2015). Sehingga OTC dijadikan sebagai pilihan sebagai produk modifikasi OTA.

Produk modifikasi OTA selanjutnya yaitu OTA-Glukosa Ester, pemilihan produk ini didasari oleh pemecahan pati menjadi gula saat masa perkecambahan (Mora-escobedo & Castro-rosas, 2019). Sehingga gula-gula sederhana akan terbentuk. Selain itu, OTA yang memiliki sifat pengikat gula akan bereaksi dengan glukosa. Pembentukan OTA-Glukosa Ester disebabkan oleh enzim glukosiltransferase yang mengalami peningkatan saat perkecambahan (Qin dkk., 2015). Sehingga OTA ini diduga akan termodifikasi menjadi OTA-Glukosa Ester.

Sampel yang dideteksi produk perubahan OTA yaitu sampel pekecambahan gelap dan perkecambahan *white light*. Pemilihan ini berdasarkan jumlah penurunan OTA yang tinggi sehingga dapat dengan mudah dideteksi juga untuk melihat pengaruh perkecambahan cahaya terhadap perubahan OTA. Hasil produk perubahan OTA yang terdeteksi pada kacang tanah hasil perkecambahan dan perkecambahan dengan cahaya yaitu OTB, OTC, OT β , dan OTA-Glukosa Ester (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Produk perubahan OTA pada perkecambahan dan perkecambahan cahaya

Sampel	Modifikasi OTA	Ion Prekursor (+)	Ion Produk (ESI) (+)
Perkecambahan	OTC	432,00	221,20
			357,90
	OTB	370,20	324,40
			352,05
	OT β	223,00	177,10
OTA-Glukosa Ester			204,95
		566,00	404,30
			239,10
Perkecambahan dengan Cahaya Putih	OTC	432,00	197,20
			210,60
	OTB		213,90
			325,45
		370,20	176,8

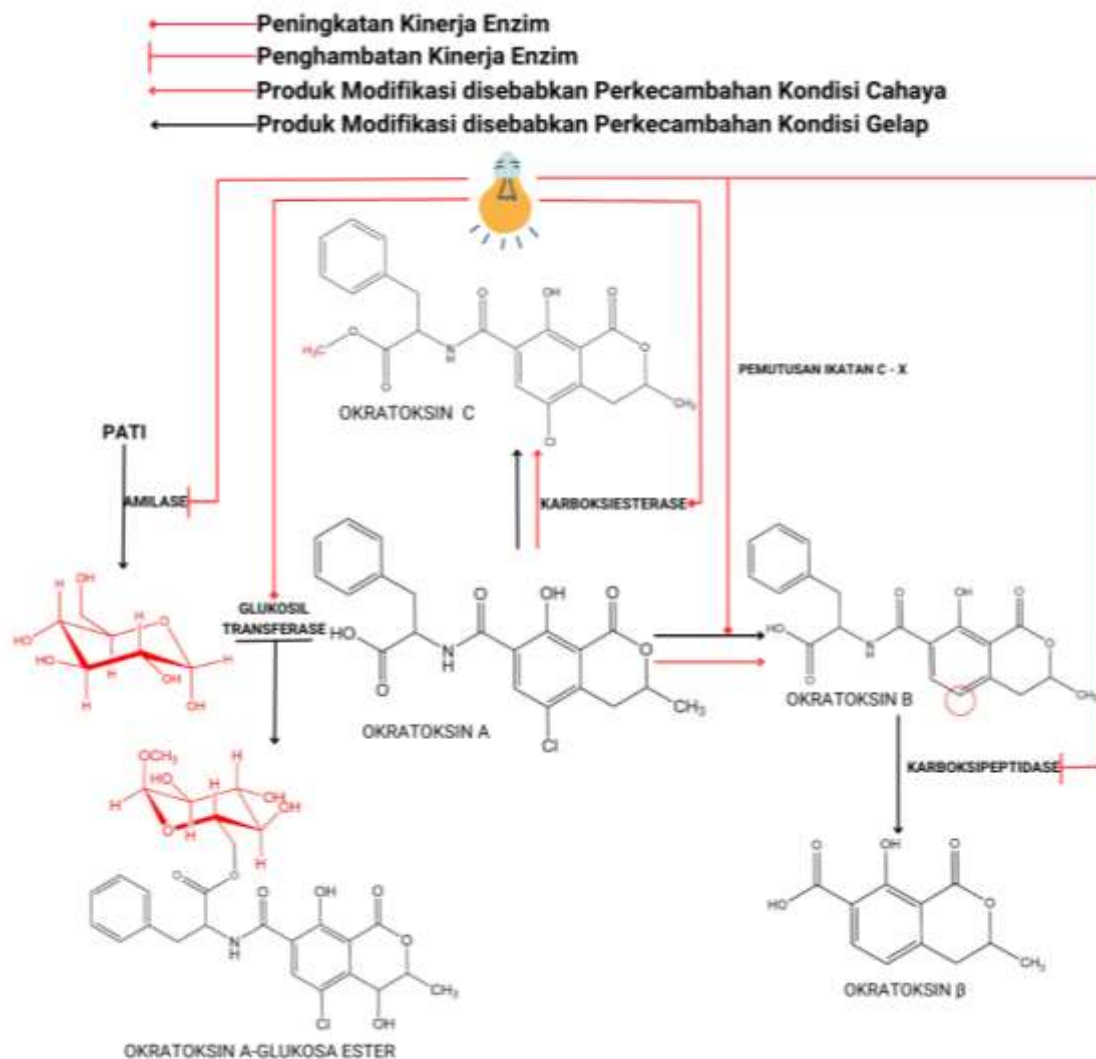
Degradasi menjadi bentuk-bentuk tersebut disebabkan hidrolisis oleh enzim peptidase, khususnya yaitu karboksipeptidase (Loi dkk., 2017). Selain degradasi, OTA juga mengalami modifikasi struktur, modifikasi dapat dibentuk melalui enzimatik, konjugasi, oksidasi, hidrolisis, *lactone opening*, hidroksilasi, dll (Berthiller dkk., 2013; Nathanail dkk., 2016; Wu dkk., 2011)

Okratoksin B (OTB) terbentuk dari deklorinasi (kehilangan klorin) OTA (Heussner & Bingle, 2015), diikuti oleh hidrolisis enzimatik dengan pelepasan bagian fenilalanin, menghasilkan pembentukan okratoksin β (OT β). Penelitian mengenai dampak toksik OT β belum ditemukan, karena strukturnya mirip dengan OT α kemungkinan toksiknya serupa atau bahkan lebih ringan (Heussner & Bingle, 2015; H. Xiao dkk., 1996). Selain OTB, OTA juga dapat termodifikasi menjadi Okratoksin C (OTC) yang merupakan OTA metil ester yang memiliki sifat tidak

lebih toksik dari OTA (Altomare dkk., 2021). Esterifikasi merupakan reaksi antara asam karboksilat dengan alkohol. Reaksi ini merupakan reaksi reversibel yang sangat lambat, namun dapat dipercepat menggunakan asam kuat dan panas hingga menghasilkan ester (Morrison & Boyd, 2002). Sehingga esterifikasi yang terjadi pada perkecambahan dipengaruhi oleh asam kuat dan suhu. Pada perkecambahan khususnya perkecambahan cahaya dapat terjadi esterifikasi karena cahaya dapat memicu terjadinya oksidasi, hal lain juga dipengaruhi oleh tahap pengeringan yang dilakukan menggunakan suhu panas dalam waktu lama sehingga memungkinkan terjadinya esterifikasi.

Selain itu OTA juga dapat berikatan secara kovalen dengan senyawa gula seperti glukosa ester melalui konjugasi membentuk OTA-Glukosa Ester. Senyawa gula tersebut terdapat dalam kacang tanah akibat perkecambahan yang dapat mengaktifkan enzim yang memecah pati menjadi gula sederhana (Mora-escobedo & Castro-rosas, 2019). Pembentukan ikatan antara OTA dan gula sederhana disebabkan oleh enzim glukosiltransferase. Glukosiltransferase adalah enzim yang penting untuk memproduksi glikokonjugat yang beragam dan kompleks. Pembentukan ikatan glikosidik yang dikatalisis oleh glukosiltransferase terjadi antara karbohidrat dan akseptor (Jeon dkk., 2011). Enzim ini dapat meningkat selama masa perkecambahan, sehingga produk modifikasi ini diduga disebabkan oleh reaksi yang disebabkan oleh enzim ini.

Produk modifikasi OTA dengan kondisi *light white* memiliki produk modifikasi OTA lebih sedikit, hal ini diduga karena pada kondisi ini diduga terdapat enzim-enzim yang terhambat. Enzim karboksipeptidase mengalami penghambatan aktivitas ketika dipapari oleh sinar *visible*, sehingga menyebabkan tidak terbentuknya pemutusan pada ikatan peptida pada OTA (Ibarz, dkk. 2009). Pada perkecambahan dengan kondisi cahaya produk OTA terkonjugasi gula tidak terdeteksi diduga karena enzim-enzim yang memproduksi gula seperti enzim amilase tersebut mengalami penghambatan aktivitas enzim (N. Sun dkk., 2016), sehingga terjadi penurunan produksi gula sehingga OTA tidak dapat berikatan dengan gula. Berikut jalur modifikasi OTA disebabkan oleh perkecambahan dalam kondisi cahaya (**Gambar 4.7**).



Gambar 4.7 Jalur modifikasi OTA disebabkan oleh perkecambahan dengan kondisi cahaya diadaptasi dari Freire dkk. (2019); Huang dkk. (2022); Ibarz dkk. (2009); Korobczak et al. (2005); Kovač dkk. (2018); Qin et al. (2015); dan Tavano (2013).

Kondisi perkecambahan dapat mempengaruhi konsentrasi OTA dan menghasilkan produk modifikasi OTA. Perkecambahan dengan kondisi gelap dan kondisi cahaya telah terbukti dapat menurunkan kadar OTA dengan memodifikasi OTA menjadi beberapa senyawa turunan OTA yang toksik menjadi produk-produk modifikasi non toksik.

Produk modifikasi OTA ini kemungkinan disebabkan oleh adanya peningkatan enzim yang disebabkan oleh perkecambahan. Diantaranya, enzim karboksipeptidase yang dapat membentuk OT(β), karboksiesterase yang dapat

membentuk OTC, enzim glukosiltransferase yang dapat membentuk OTA-Glukosa Ester dan juga kondisi eksternal seperti suhu dan udara yang dapat menyebabkan terbentuknya OTB. Jalur modifikasi OTA disebabkan oleh perkecambahan ditunjukkan pada **Gambar 4.7**.

Produk modifikasi OTA dengan kondisi *light white* memiliki produk modifikasi OTA lebih sedikit, hal ini diduga karena pada kondisi ini diduga terdapat enzim-enzim yang terhambat yang disebabkan paparan *light white*. Enzim karboksipeptidase mengalami penghambatan aktivitas ketika dipapari oleh sinar *visible*, sehingga menyebabkan tidak terbentuknya pemutusan pada ikatan peptida pada OTA (Ibarz, dkk. 2009). Maka dari itu perkecambahan dengan kondisi cahaya tidak menimbulkan produk OT(β). Selain itu, pada perkecambahan dengan kondisi cahaya produk OTA terkonjugasi gula yaitu OTA-Glukosa Ester yang terbentuk dari ikatan ester antara OTA dengan Glukosa dengan bantuan enzim glukosiltransferase tidak terdeteksi. Enzim glukosiltransferase dapat mengalami peningkatan aktivitas ketika diberi cahaya. Hal ini tidak sesuai dengan hasil dimana OTA-Glukosa Ester ini tidak terdeteksi pada perkecambahan cahaya hal ini diduga karena enzim-enzim yang memproduksi glukosa sebagai prekursor pembentukan OTA-Glukosa Ester seperti enzim amilase tersebut mengalami penghambatan aktivitas enzim (N. Sun dkk., 2016), hal ini menyebabkan tidak terjadi pembentukan OTA-Glukosa Ester. Berikut jalur modifikasi OTA disebabkan oleh perkecambahan dalam kondisi cahaya (**Gambar 4.7**).