

AKTIVITAS ANTIAFLATOKSIN B₁ EKSTRAK DAUN RUMPUT KEBAR (*Biophytum petersianum*) TERHADAP *Aspergillus flavus*

Antiaflatoxin B₁ Activity of Kebar Grass (*Biophytum petersianum*) Leaf Extract on *Aspergillus flavus*

Meike Meilan Lisangan^{1,2}, Rizal Syarief³, Winiati Pudji Rahayu^{3,4}, Okky Setyawati Dharmaputra^{5,6}

¹Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat 16680

²Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian dan Teknologi Pertanian, Universitas Negeri Papua, Jl. Gunung Salju Amban Manokwari, Papua Barat 98314

³Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat 16680

⁴Southeast Asia Food and Agriculture Science and Technology Center (SEAFST), Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat 16680

⁵Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor, Jawa Barat 16680

⁶Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology (SEAMEO BIOTROP), Jl. Raya Tajur, Bogor, Jawa Barat 16680
Email: wini_a@hotmail.com

ABSTRAK

Aflatoxin B₁ merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* yang berbahaya bagi kesehatan karena bersifat karsinogenik. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mencari bahan antikapang dan antiaflatoxin yang berasal dari bahan alami seperti tumbuhan. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari aktivitas ekstrak daun rumput kebar terhadap pertumbuhan miselium dan produksi aflatoxin B₁ dari isolat *A. flavus* BC F0219 dan *A. flavus* BIO 2236 pada media model pangan kaya karbohidrat, lemak dan protein. Ekstrak daun rumput kebar diekstraksi secara bertingkat dengan pelarut n-heksana-etil asetat-metanol (HEM). Konsentrasi ekstrak yang diuji untuk isolat *A. flavus* BCC F0219 dan *A. flavus* BIO 2236 masing-masing adalah 1; 1,5; dan 2 MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Nilai MIC untuk *A. flavus* BCC F0219 pada media kaya karbohidrat, lemak, dan protein berturut-turut sebesar 12, 14, dan 14 mg/mL. Sedangkan nilai MIC untuk *A. flavus* BIO 2236 pada media kaya karbohidrat, lemak, dan protein berturut-turut sebesar 12, 16, dan 16 mg/mL. Hasil pengujian memperlihatkan bahwa persentase hambatan pertumbuhan isolat *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 pada media kaya karbohidrat, lemak dan protein pada 3 tingkat konsentrasi MIC berkisar antara 90,8 – 100% dan 93,8 – 100%. Hambatan produksi aflatoxin B₁ isolat *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 pada media kaya karbohidrat, lemak dan protein pada 3 tingkat konsentrasi MIC berkisar antara 70,86 – 100% dan 83,42 – 98,84%.

Kata kunci: Aflatoxin B₁, anti aflatoxin, *Aspergillus flavus*, *Biophytum petersianum*, media model pangan, rumput kebar

ABSTRACT

Aflatoxin B₁ was a secondary metabolite produced by *Aspergillus flavus* having negative effect on human health because of its carcinogenic. Many efforts have been done to investigate the antifungal and antiaflatoxin agent derived plant. The objective of this research was to study the activity of antifungal from kebar grass leaf extract on mycelial growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* BCC F0219 and *A. flavus* BIO 2236 isolates in food model medium i.e. carbohydrate-enriched medium, fat-enriched medium and protein-enriched medium. Kebar grass leaf extracts was successively obtained by using n-hexane - ethyl acetate - methanol (HEM). Concentrations of the extract tested on *A. flavus* BCC F0219 and *A. flavus* BIO 2236 were 1; 1.5, and 2 MIC. The MIC for *A. flavus* BCC F0219 in carbohydrate-enriched medium, fat-enriched medium, and protein-enriched medium were 12, 14, and 14 mg/mL,

respectively. Meanwhile, the MIC for *A. flavus* BIO 2236 in carbohydrate-enriched medium, fat-enriched medium and protein-enriched medium were 12, 16 and 16 mg/mL, respectively. The results showed that the percentage of growth inhibition of *A. flavus* BCC F0219 and BIO 2236 in carbohydrate, fat and protein-enriched medium at 3 different levels of MIC concentrations ranged between 90.8 - 100% and 93.8 - 100%. The inhibitory effect of Aflatoxin B₁ production of *A. flavus* F0219 BCC and BIO 2236 in carbohydrate, fat and protein-enriched medium at 3 different levels of MIC concentration ranged between 70.86 - 100 % and 83.42 – 98.84 %.

Keywords: Aflatoxin B₁, anti aflatoxin, *Aspergillus flavus*, *Biophytum petersianum*, food model medium, kebar grass

PENDAHULUAN

Aflatoxin merupakan mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* yang bersifat hepatotoksik, mutagenik, teratogenik, dan karsinogenik bagi manusia dan hewan (Alberts dkk., 2006). Selain berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan, kontaminasi aflatoxin pada pangan dan pakan juga mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup signifikan berkisar antara US \$85 - 100 juta di USA (Alberts dkk., 2009). Di Indonesia, kerugian di bidang pertanian akibat aflatoxin adalah penolakan produk ekspor Indonesia seperti kakao dan pala, sedangkan di bidang peternakan antara lain penurunan kualitas dan kuantitas produk peternakan karena adanya residu aflatoxin (Rachmawati dkk., 2004).

Kontaminasi aflatoxin sulit dihindari sepenuhnya sehingga diperlukan teknologi yang mampu meminimalisir kontaminasi aflatoxin tanpa mempengaruhi citarasa dan nilai nutrisi bahan pangan serta keamanannya (Murugan dkk., 2013). Berbagai upaya telah dilakukan untuk mencari bahan antikapang dan antiaflatoxin yang berasal dari bahan alami seperti tumbuhan (Sa´nchez dkk., 2005).

Rumput kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch), merupakan tumbuhan asli dari Kecamatan Kebar, Kabupaten Manokwari, Provinsi Papua Barat, yang umumnya tumbuh secara alami dan menyebar di hampir seluruh wilayah Kecamatan Kebar (Santoso dkk., 2007). Rumput kebar diketahui berpotensi sebagai antibakteri, hipoglikemik, imunomodulator, kemoprotektif, hipokolesterolemik, apoptosis, antiinflamasi, antitumor dan biosintesis prostaglandin (Natarajan dkk., 2010), mempengaruhi ekspresi COX-2 (Guruvayoorappan dan Kuttan, 2008), menstimulasi sel-sel sistem kekebalan tubuh (Inngjerdigen dkk., 2008), dan mempengaruhi apoptosis sel-sel B16F-10 dan penghambatan produksi NO dan sitokin yang berperan dalam pembentukan tumor (Guruvayoorappan dan Kuttan, 2007).

Penelitian Lisangan dkk. (2014a) menghasilkan jenis ekstrak bertingkat Heksana-Etilasetat-Metanol (HEM) sebagai jenis ekstrak yang paling efektif menghambat pertumbuhan kapang *A. flavus*. Sedangkan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang diperoleh dari penelitian Lisangan

dkk. (2014b) untuk *A. flavus* BCC F0219 pada media kaya karbohidrat, lemak dan protein berturut-turut sebesar 12, 14, dan 14 mg/mL, dan nilai MIC untuk *A. flavus* BIO 2236 pada media kaya karbohidrat, lemak dan protein berturut-turut sebesar 12, 16, dan 16 mg/mL. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas penghambatan dan pola pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 dan *A. flavus* BIO 2236 serta produksi aflatoxin B₁ oleh ekstrak HEM daun rumput kebar pada media kaya karbohidrat, lemak, dan protein.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan baku utama adalah jenis ekstrak HEM daun rumput kebar yang diperoleh dari penelitian Lisangan dkk. (2014a). Isolat kapang yang digunakan adalah *A. flavus* BCC F0219 yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor dan *A. flavus* BIO 2236 yang diperoleh dari SEAMEO BIOTROP *Culture Collection*. Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah bahan kimia dengan kualitas *pro analysis* (JT. Baker, USA), sedangkan bahan kimia untuk analisis aflatoxin B₁ adalah bahan kimia dengan kualitas HPLC *grade* (Merck). Media pertumbuhan mikroba adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*, Oxoid), *Bacto agar* (Difco), santan kelapa, susu skim (Difco), glukosa (Merck). Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat gelas untuk ekstraksi, seperangkat alat HPLC (Agilent 1260 Infinity Isocratic LC), *shaker*, mikropipet, alat pemanas (*hot plate*), pengaduk (*stirrer*), jangka sorong, dan alat-alat gelas.

Persiapan Ekstrak Tumbuhan

Ekstrak HEM daun rumput kebar yang digunakan adalah jenis ekstrak yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Lisangan dkk., 2014a). Ekstrak diperoleh dengan cara maserasi dan sonifikasi menurut metode Deng dkk. (2011) kemudian dianalisis dengan py/GC-MS. Ekstrak didominasi oleh senyawa fenolik (26,56%) dan terpena (15,60%). Ekstrak kemudian disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan untuk pengujian aktivitas antikapang (Tian dkk., 2011) dan produksi aflatoxin B₁ (AOAC, 2005).

Persiapan Konidium Kapang (Joseph dkk., 2005)

Isolat kapang ditumbuhkan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*, Oxoid, Inggris) miring dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 5 hari. Konidium dipanen dengan menambahkan 10 mL akuades steril dan dikumpulkan secara aseptik. Pada suspensi konidium ditambahkan Tween 80 (0,5%). Suspensi konidium kapang dihitung menggunakan hemasitometer, konsentrasi konidium diatur menjadi 10⁶ CFU/mL.

Persiapan Media Model Pangan yang Diperkaya dengan Sumber Karbohidrat (Shih dan Marth, 1974a), Lemak (Riba dkk., 2010), dan Protein (Mellon dan Cotty, 1998)

Penyiapan media kaya karbohidrat diwakili oleh penambahan glukosa (30% w/v) pada media *bacto agar*. Penyiapan media kaya lemak dilakukan dengan menghomogenasi 100 g parutan daging kelapa menggunakan 300 mL akuades panas (60°C) selama 5 menit. Homogenat disaring menggunakan saringan berukuran 80 mesh dan hasil saringan diatur pH-nya hingga pH 7,0 dengan 2N NaOH. Selanjutnya ditambahkan *Bacto agar* (Difco, USA) sebanyak 20g/L. Kedua media model pangan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media kaya protein dibuat dengan menambahkan 30% (w/ v) susu skim (Difco, USA) pada media *bacto agar* dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 10 menit.

Pengujian Penghambatan Pertumbuhan *A. flavus* (Tian dkk., 2011)

Konsentrasi ekstrak rumput kebar yang ditambahkan ke media model pangan adalah 1; 1,5 dan 2MIC (Lisangan dkk., 2014b). Sebanyak 10 mL media model pangan yang mengandung ekstrak dituang ke dalam cawan petri (diameter 9 cm) dan dibiarkan memadat. Masing-masing 5 µL suspensi konidium *A. Flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 diinokulasi pada permukaan setiap media dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 10 hari. Diameter koloni (dalam mm) diamati setiap 24 jam selama 10 hari. Sebagai kontrol negatif, kultur kapang ditumbuhkan pada media model pangan tanpa kandungan ekstrak rumput kebar, sedangkan sebagai kontrol positif digunakan media model pangandengan *ketoconazole* 5mg/mL. Perlakuan dirancang dua kali ulangan dengan analisis duplo. Persentase penghambatan pertumbuhan kapang dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Hambatan pertumbuhan} = \frac{(dc - dt)}{dc} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

dc = diameter koloni kontrol negatif
dt = diameter koloni perlakuan

Ekstraksi dan Analisis Kandungan Aflatoksin B₁ (AOAC, 2005)

Sampel berupa media tumbuh dan biomassa kapang yang berasal dari pertumbuhan kapang selama 10 hari ditimbang sebanyak 10 g, ditambahkan 2 g NaCl dan 50 mL metanol 70% kemudian diblender selama 2 menit. Larutan kemudian disaring dengan kertas saring bergalur lalu filtrat sebanyak 6 mL dipindahkan ke Erlenmeyer, ditambahkan akuades 12 mL, divorteks, kemudian disaring dengan kertas saring *microfiber filter*. Filtrat kemudian dipipet sebanyak 6 mL dan dimasukkan ke dalam *syringe barrel connection* yang dihubungkan dengan *immunoaffinity column* (VICAM) kemudian didorong dengan *air pump* dengan kecepatan 2 tetes/detik sampai muncul gelembung pada ujung aflatest (VICAM). Filtrat dilusi dengan 1 mL metanol *grade* HPLC dengan kecepatan 1 tetes/detik, kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL akubides *grade* HPLC dan divorteks. Sebanyak 20 µL alikuot diinjeksi ke sistem HPLC. Deteksi aflatoksin B₁ menggunakan HPLC (Agilent 1260 Infinity Isocratic LC). Kondisi operasi HPLC menggunakan kolom Poroshell 120 SB C18, 4.6x150 mm x 2.7µm, derivatisasi pasca kolom menggunakan *Photochemical Reactor Derivatization* (PHRED) merk AURA, detektor fluoresensi (Kratos 950), panjang gelombang eksitasi 365 nm dan emisi 465 nm, fase gerak H₂O : ACN : MeOH (60:20:20), laju alir 1 mL/menit, sistem elusi isokratik, suhu kolom dan post kolom 40 °C, dengan waktu *running* 15 menit, limit deteksi (LOD) 0,45 ng/mL sedangkan LOQ 1,5 ng/mL. Perlakuan dirancang dua kali ulangan dengan analisis duplo. Persentase penghambatan produksi aflatoksin B₁ dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Hambatan produksi AFB}_1 = \frac{(Ac - At)}{Ac} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Ac = kandungan AFB₁ kontrol negatif
At = kandungan AFB₁ perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hambatan Pertumbuhan Kapang

Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa ekstrak HEM daun rumput kebar dengan konsentrasi 1 MIC dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 dengan tingkat penghambatan di atas 90%. Pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi (1,5 dan 2 MIC) dapat menghambat secara total (100%) pertumbuhan kedua isolat kapang, kecuali *A. flavus* BIO 2236 pada media kaya karbohidrat dengan persentase hambatan 98.9% pada konsentrasi 1,5 MIC (Tabel 1). *Ketoconazole* dengan konsentrasi 5 mg/mL juga menghambat pertumbuhan kedua isolat kapang tersebut secara total.

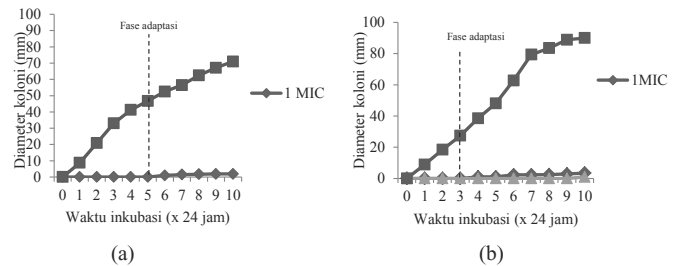
Penghambatan ekstrak HEM daun rumput kebar terhadap pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 relatif lebih tinggi dibandingkan *A. flavus* BIO 2236 di media kaya karbohidrat. Pemberian ekstrak HEM daun rumput kebar dengan konsentrasi 1 MIC memperpanjang fase adaptasi *A. flavus* BCC F0219 hingga 5x24 jam (Gambar 1a) sedangkan pertumbuhan *A. flavus* BIO 2236 pada media kaya karbohidrat dapat diperpanjang fase adaptasinya hingga 3x24 jam (Gambar 1b). Pada media kaya lemak, penghambatan pertumbuhan oleh ekstrak HEM daun rumput kebar terhadap *A. flavus* BCC F0219 lebih rendah dari *A. flavus* BIO 2236 (Tabel 1) dan fase adaptasinya hanya diperpanjang hingga 2x24 jam (Gambar 2a) sedangkan fase adaptasi *A. flavus* BIO 2236 diperpanjang hingga 9x24 jam (Gambar 2b). Demikian pula halnya pola pertumbuhan kedua isolat kapang ini pada media kaya protein. Namun fase adaptasi kedua isolat kapang ini sama yaitu dapat diperpanjang hingga 2x24 jam (Gambar 3). Secara keseluruhan, pemberian ekstrak HEM daun rumput kebar mampu memperpanjang fase adaptasi kedua isolat *A. flavus*. Adam dan Moss (1995) mengemukakan bahwa fase adaptasi mikrobia dipengaruhi oleh adanya bahan kimia, pemanasan, pendinginan, dan perlakuan fisiko-kimia lainnya.

Tabel 1. Pengaruh ekstrak HEM daun rumput kebar terhadap pertumbuhan *A. flavus* BCCF0219 dan BIO 2236 pada media kaya karbohidrat, lemak, dan protein

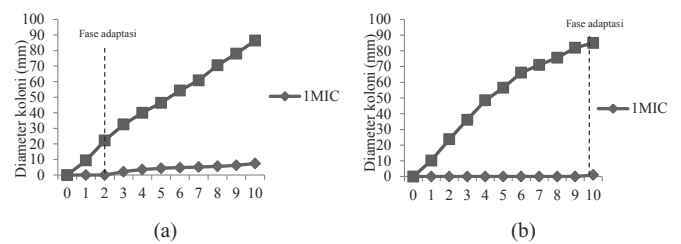
Isolat kapang	Jenis media model pangan	Kons. ekstrak dlm mg/mL (MIC)	Diameter koloni (mm) ± SD	Penghambatan (%) ± SD
BCC F0219	Karbohidrat	0	71,0±3,5	0,0±0,0
		12 (1MIC)	1,9±2,9	97,9±3,0
	Lemak	0	86,4±2,3	0,0±0,0
		14 (1MIC)	5,8±0,6	93,5±2,9
	Protein	0	89,3±0,4	0,0±0,0
		14 (1MIC)	7,9±0,3	90,8±0,3
BIO 2236	Karbohidrat	0	90,0±0,0	0,0 ± 0,0
		12 (1MIC)	4,6±2,5	93,9±3,5
		18 (1.5MIC)	1,0±1,4	98,9±1,6
	Lemak	0	85,0±6,4	0,0±0,0
		16 (1MIC)	0,4±0,9	99,4±0,8
	Protein	0	89,1±1,2	0,0±0,0
16 (1MIC)		5,6±3,1	93,8±0,7	

Perbedaan ketahanan kedua isolat kapang ini pada media yang berbeda diduga karena perbedaan kemampuan kedua isolat dalam memproduksi sklerosium. Isolat BCC F0219 tidak memproduksi sklerosium (Gambar 4a) sedangkan isolat BIO 2236 dapat memproduksi sklerosium (Gambar 4b). Sklerosium adalah massa kompak jaringan kapang

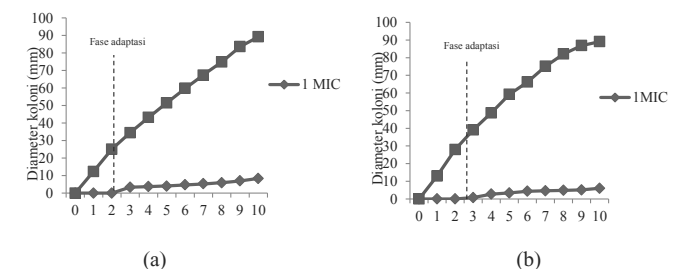
yang biasanya memiliki dinding luar kokoh dan berfungsi sebagai penyimpan bahan makanan bagi kapang. Sklerosium merupakan struktur bertahan dari kapang yang dapat bertahan dalam kondisi lingkungan yang tidak mendukung dan bersifat dorman. Sklerosium sangat berperan dalam produksi miselium dan konidium (Griffin, 1994). Sebanyak 50% isolat *A. flavus* mampu memproduksi sklerosium (Pitt dan Hocking, 2009). Adanya variasi dalam sensitivitas kapang terhadap ekstrak dapat juga disebabkan oleh kemampuan kapang dalam memetabolisme komponen aktif dari ekstrak tumbuhan yang mengakibatkan terjadinya detoksifikasi ekstrak oleh kapang (Griffin, 1994).



Gambar 1. Pola pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 (a) dan BIO 2236 (b) pada media kaya karbohidrat



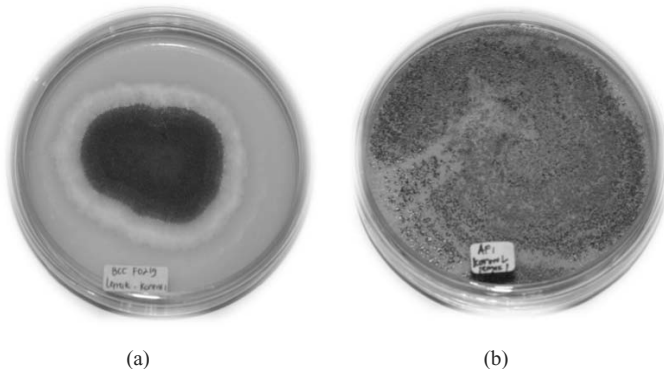
Gambar 2. Pola pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 (a) dan BIO 2236 (b) pada media kaya lemak



Gambar 3. Pola pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 (a) dan BIO 2236 (b) pada media kaya protein

Penghambatan pertumbuhan kapang oleh ekstrak HEM daun rumput kebar dikarenakan ekstrak HEM daun rumput kebar mengandung senyawa fenolik seperti flavonoid dan fenolhidrokuinon (Lisangan dkk., 2014a). Penelitian Lisangan, dkk. (2014b) telah mengidentifikasi komponen-komponen

mayor yang mendominasi ekstrak HEM daun rumput kebar yaitu dari golongan fenolik, senyawa hidrokarbon, terpena, dan alkohol. Flavonoid dan fenolhidrokuinon telah dilaporkan memiliki sifat antimikrob (Sule dkk., 2011; Jaberindkk., 2013). Ekstrak HEM juga mengandung triterpenoid, steroid, tanin, dan saponin. Ketiga golongan senyawa ini dilaporkan memiliki aktivitas antikapang (Houghton dkk., 2003; Onwuliri dan Wonang, 2005; Jaberindkk., 2013; Marei dkk., 2012; Sko ibuši dkk., 2006).



Gambar 4. Pembentukan konidium oleh *A. flavus* BCC F0219 (a) dan pembentukan konidium serta sklerosium pada *A. flavus* BIO 2236 (b)

Media kaya karbohidrat (glukosa) merupakan jenis media yang disukai *A. flavus* karena mendukung produksi aflatoxin. Diener dan Davis (1969) mengemukakan bahwa karbohidrat merupakan pendukung utama pertumbuhan kapang dan produksi aflatoxin. Shih dan Marth (1974a) menambahkan bahwa pada konsentrasi glukosa 5-20% terjadi pertumbuhan kapang yang sangat cepat dan menghasilkan berat kering miselium yang maksimal. Namun sebaliknya, pada konsentrasi 30%, terjadi penurunan berat kering miselium kapang tetapi terjadi pembentukan aflatoxin yang optimal. Peningkatan konsentrasi glukosa lebih dari 30% mengakibatkan penurunan berat kering miselium dan sintesis aflatoxin. Ditambahkan pula bahwa efisiensi pemanfaatan glukosa oleh kapang akan menurun dengan semakin meningkatnya konsentrasi glukosa. Shih dan Marth (1974b) menegaskan bahwa pertumbuhan *A. parasiticus* pada media tumbuh yang mengandung glukosa terjadi sangat cepat pada 3 hari pertama, dan selanjutnya mengalami penurunan. Penghambatan kedua isolat pada media kaya karbohidrat dengan konsentrasi 1 MIC menyebabkan intervensi ekstrak mengganggu metabolisme glukosa sebagai sumber karbon yang berakibat pada terganggunya pertumbuhan kedua isolat *A. flavus*.

Pertumbuhan kedua isolat *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 pada media kaya lemak (Gambar 2) memperlihatkan bahwa konsentrasi ekstrak HEM daun rumput kebar yang

dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 lebih tinggi daripada media kaya karbohidrat. Hal ini disebabkan karena lemak dapat menurunkan aktivitas antikapang karena komponen aktif ekstrak tumbuhan yang hidrofobik akan berikatan dengan gugus hidrofilik lemak (da Cruz Cabral dkk., 2013). Yu dkk. (2003) mengemukakan bahwa pengaruh lemak terhadap pertumbuhan kapang telah diteliti oleh beberapa peneliti. Ditambahkan pula bahwa oksidasi ergosterol dapat menginduksi pertumbuhan kapang. Diener dan Davis (1969) menambahkan bahwa selain ergosterol, hidrolisis asam-asam lemak pada santan kelapa juga menghasilkan gliserol yang mendukung pertumbuhan kapang. Lebih lanjut ditegaskan pula bahwa asam-asam lemak jenuh seperti asam laurat, miristat, palmitat, dan stearat mendukung pertumbuhan kapang sedangkan asam-asam lemak tidak jenuh seperti oleat, linoleat dan linolenat menghambat pertumbuhan kapang (Arseculeratne dkk., 1969; Yong dkk., 2009). Penggunaan santan kelapa sebagai sumber lemak pada media tumbuh dalam penelitian ini mengindikasikan kemungkinan terjadi oksidasi asam-asam lemak pada santan kelapa yang berefek pada pembentukan asam lemak bebas jenuh yang mendukung pertumbuhan kapang. Akibatnya, dibutuhkan ekstrak HEM daun rumput kebar dengan konsentrasi yang lebih tinggi untuk menghambat pertumbuhan kapang.

Pertumbuhan kedua isolat *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 pada media kaya protein (Gambar 3) memperlihatkan konsentrasi ekstrak HEM daun rumput kebar yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 lebih tinggi daripada yang dibutuhkan pada media kaya karbohidrat. Hal ini disebabkan karena protein dapat menurunkan aktivitas antikapang ekstrak tumbuhan karena berikatan dengan komponen ekstrak (da Cruz Cabral dkk., 2013). Payne dan Hagler (1983) mengemukakan bahwa asam-asam amino pada protein sangat berperan sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhan kapang. Mellon dan Cotty (1998) mengemukakan bahwa pada media yang diberi tambahan protein berupa kolagen, *bovine serum albumin*, zein (protein jagung), dan *cottonseed storage protein* memperlihatkan produksi biomassa yang lebih banyak dibanding kontrol. Dalam penelitian ini, sebagai sumber protein digunakan susu skim yang kaya akan asam-asam amino (U.S. Dairy Export Council, 2005). Namun tingginya kandungan asam amino pada susu skim menyebabkan ekstrak HEM daun rumput kebar yang ditambahkan pada media justru berikatan dengan protein pada susu skim sehingga dibutuhkan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi untuk menghambat pertumbuhan kedua isolat kapang.

Hambatan Produksi Aflatoksin B₁ (AFB₁)

Pengaruh ekstrak HEM daun rumput kebar terhadap produksi AFB₁ dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa ada keterkaitan antara penghambatan pertumbuhan kapang dengan penghambatan produksi AFB₁. Pada media kaya lemak, ekstrak HEM daun rumput kebar dengan konsentrasi 1MIC dapat menghambat produksi AFB₁ lebih kuat (99,2%) daripada menghambat pertumbuhan *A. flavus* BCC F0219 (93,5%), sedangkan penghambatan produksi AFB₁ pada *A. flavus* BIO 2236 lebih lemah (91,3%) daripada penghambatan pertumbuhannya (99,4%). Pada media kaya protein, ekstrak HEM daun rumput kebar lebih kuat menghambat pertumbuhan kedua isolat dari pada produksi AFB₁. Namun terlihat adanya kecenderungan penghambatan pertumbuhan kedua isolat berhubungan dengan penghambatan produksi AFB₁. Pada media kaya karbohidrat dan lemak, penghambatan produksi AFB₁ *A. flavus* BCC F0219 mencapai 100 dan 99,2%, sedangkan pada media kaya protein hanya 70,9%. Sebaliknya isolat *A. flavus* BIO 2236 pada media kaya protein menghasilkan AFB₁ yang lebih tinggi dibanding kedua jenis media lainnya, namun persentase penghambatan oleh ekstrak HEM daun rumput kebar juga lebih tinggi. Kumar dkk. (2010) dan Tian dkk. (2011) mengemukakan bahwa ada korelasi langsung antara pertumbuhan kapang dan produksi AFB₁. Pertumbuhan miselium berkorelasi dengan sintesis enzim yang berperan dalam produksi AFB₁ sehingga pertumbuhan miselium yang lebat pada *A. flavus* menyebabkan produksi aflatoksinnya juga tinggi. Lebih lanjut dikatakan bahwa kondisi lingkungan yang dibutuhkan

untuk pembentukan konidium, sklerosium, dan metabolisme sekunder adalah sama (Yu dkk., 2003). Meskipun demikian, penghambatan produksi AFB₁ tidak selalu disebabkan oleh pertumbuhan kapang yang tereduksi tetapi dapat disebabkan oleh penghambatan katabolisme karbohidrat *A. flavus* dengan cara mempengaruhi beberapa enzim kunci yang pada akhirnya menurunkan kemampuan *A. flavus* untuk memproduksi AFB₁ (Tatsadjieu dkk., 2009). Pitt (1993) mengemukakan bahwa penghambatan produksi aflatoksin mungkin disebabkan oleh enzim yang dilepaskan saat terjadi lisis pada miselium kapang. Ditambahkan pula oleh Namazi dkk. (2002) kerusakan miselium dan konidium kapang merupakan salah satu ciri proses deaktivasi aflatoksin.

Ekstrak HEM daun rumput kebar mengandung senyawa fenolik yang merupakan salah satu penyebab penghambatan produksi AFB₁. Kumar dkk. (2010) mengemukakan bahwa adanya komponen fenolik pada minyak atsiri *Ocimum sanctum* mampu mereduksi pertumbuhan kapang dan produksi AFB₁. Penghambatan produksi aflatoksin oleh komponen fenolik juga dikemukakan oleh Kim dkk. (2006) yang menyatakan bahwa mitokondria berperan dalam penyediaan asetil-CoA yang merupakan prekursor utama dalam biosintesis aflatoksin. Kerusakan rantai respirasi mitokondrial yang disebabkan oleh komponen fenolik merupakan bagian dari penghambatan produksi aflatoksin. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak HEM daun rumput kebar tidak hanya mampu menghambat pertumbuhan kedua isolat *A. flavus* tetapi juga mampu menghambat produksi AFB₁.

Tabel 2. Reduksi aflatoksin B₁ oleh ekstrak HEM daun rumput kebar pada media model

Isolat	Jenis media	Kons. Ekstrak dalam mg/mL (MIC)	Kadar (ng/g)		Reduksi (%)	
			AFB ₁ ^a	AF-total	AFB ₁	AF total
<i>A. flavus</i> BCC F0219	Karbohidrat	kontrol (0MIC)	6,74 ± 0,07	15,56		
		12 (1MIC)	tt	tt	tt	tt
	Lemak	kontrol (0MIC)	1342,89 ± 8,82	1349,14		
		14 (1MIC)	11,01 ± 0,08	35,04	99,2	97,4
	Protein	kontrol (0MIC)	93,18 ± 0,75	325,12		
		14 (1MIC)	27,16 ± 0,03	27,79	70,9	91,5
<i>A. flavus</i> BIO 2236	Karbohidrat	kontrol (0MIC)	33,36 ± 0,04	136,56		
		12 (1MIC)	5,53 ± 0,07	16,56	83,4	87,9
	Lemak	kontrol (0MIC)	961,05 ± 0,50	1517,94		
		16 (1MIC)	83,37 ± 0,12	112,41	91,3	92,6
	Protein	kontrol (0MIC)	1188,07 ± 2,12	1628,62		
		16 (1MIC)	13,78 ± 0,28	37,06	98,8	97,7

^a data adalah rata-rata dari dua ulangan ± standar deviasi

tt : tidak terdeteksi

KESIMPULAN

Ekstrak HEM daun rumput kebar dapat menghambat pertumbuhan dan produksi AFB₁ dari *A. flavus* BCC F0219 dan BIO 2236 baik pada media kaya karbohidrat, lemak dan protein. Oleh karena itu, ekstrak HEM daun rumput kebar berpotensi untuk digunakan sebagai salah satu bahan alami untuk mengendalikan pertumbuhan kapang *A. flavus* dan menghambat produksi aflatoxin. Kedepannya perlu dikaji lebih jauh aplikasi ekstrak HEM daun rumput kebar pada bahan pangan, keamanannya, dan sifat organoleptiknya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada *Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology* (SEAMEO BIOTROP) yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah disertasi doktor DIPA BIOTROP tahun anggaran 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, M.R. dan Moss, M.O. (1995). *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Alberts, J.F., Engelbrecht, Y., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H. dan van Zyl, W.H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology* **109**: 121-126.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Botha, A. dan van Zyl, W.H. (2009). Degradation of aflatoxin B₁ by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology* **135**: 47-52.
- AOAC (2005). AOAC, International official methods of analysis, Method, Gaithersburg, MD. 2005.08.
- Arseculeratne, S.N., de Silva, L.M., Wijesundera, S. dan Bandunatha, C.H.S.R. (1969). Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Applied Microbiology* **18**: 88-94.
- Brusotti, G., Tosi, S., Tava, A., Picco, A.M., Grisoli, P., Cesari, I. dan Caccialanza, G. (2013). Antimicrobial and phytochemical properties of stem bark extracts from *Piptadeniastrum africanum* (Hook. f.) Brenan. *Industrial Crops and Products* **43**: 612-616.
- da Cruz Cabral, L., Pinto, V.F. dan Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods (Review). *International Journal of Food Microbiology* **166**: 1-14.
- Davis, N.D., Iyer, S.K. dan Diener, U.L. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1593-1595.
- Deng, Y., Yu, Y., Luo, H., Zhang, M., Qin, X. dan Li, L. (2011). Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*. *Food Chemistry* **124**: 1556-1560.
- Diener, U.L. dan Davis, N.D. (1969). Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Dalam: Goldblatt, L.A. (ed.). *Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications*, hal. 13-39. Academic Press, New York.
- Garcia, D., Garcia-Cela, E., Ramos, A.J., Sanchis, V. dan Marín, S. (2011). Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Steviarebaudiana* extracts. *Food Control* **22**: 1378-1384.
- Griffin, G.H. (1994). *Fungal Physiology*. 2nd edn. Wiley-Liss, New York.
- Guruvayoorappan, C. dan Kuttan, G. (2007). Immunomodulatory and antitumor activity of *Biophytumsensitivum* extract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **8**: 27-32.
- Guruvayoorappan, C. dan Kuttan, G. (2008). Methanol extract of *Biophytumsensitivum* alters the cytokine profile and inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS/Con A stimulated macrophages. *Drug and Chemical Toxicology* **31**: 175-188.
- Houghton, P.J. dan Raman, A. (2003). *Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extracts*. London (GB): Chapman and Hall Pr.
- Inngjerdigen, M., Inngjerdigen, K.T., Patel, T.R., Allen, S., Chen, X., Rolstad, B., Morris, G.A., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D. dan Paulsen, B.S. (2008). Pectic polysaccharides from *Biophytumpetersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells. *Glycobiology* **12**: 1074-1084.
- Jaberian, H., Piri, K. dan Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry* **136**: 237-244.
- Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., Selvi, A.T., Jena, B.S. dan Sakariah, K.K. (2005). Antiaflatoxinigenic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. *International Journal of Food Microbiology* **101**: 153-160.
- Kim, J.H., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R. dan Campbell, B.C. (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting antioxidant stress-response system

- with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70**: 735-739.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P. dan Dubey, N.K. (2010). Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 539-54.
- Lisangan, M.M., Syarief, R., Rahayu, W.P. dan Dharmaputra, O.S. (2014a). Antifungal activity of kebar grass leaf extracts on the growth of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in food model media. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* **17**: 116-128.
- Lisangan, M.M., Syarief, R., Rahayu, W.P. dan Dharmaputra, O.S. (2014b). The Effect of Kebar Grass [*Biophytum petersianum* Klotzsch] Extraction on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Production in Food System Model. *Research Report, Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology (SEAMEO BIOTROP)*.
- Marei, G.I.K., Abdel Rasoul, M.A. dan Abdelgaleil, S.A.M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **103**: 56-61.
- Mellon, J.E. dan Cotty, P.J. (1998). Effects of oilseed storage proteins on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the American Oil Chemists Society* **75**: 1085-1089.
- Murugan, K., Anandaraj, K. dan Al-Sohaibani, S. (2013). Antiaflatoxic food additive potential of *Murraya koenigii*: An *in vitro* and molecular interaction study. *Food Research International* **52**: 8-16.
- Namazi, M., Allameh, A., Aminshahidi, M., Nohee, A. dan Malekzadeh, F. (2002). Inhibitory effect of ammonia solution on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL-2999. *Acta Poloniae Toxicologica* **10**: 65-72.
- Natarajan, D., Shivakumar, M.S. dan Srinivasan, R. (2010). Antibacterial activity of leaf extracts of *Biophytum sensitivum* (L.) DC. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2**: 717-720.
- Onwuliri, F.C. dan Wonang, D.L. (2005). Studies on the combined antibacterial action of Ginger (*Zingiber officinale* L) and Garlic (*Allium sativum* L) on some bacteria. *Nigerian Journal of Botany* **18**: 224-228.
- Payne, G.A. dan Hagler Jr., W.M. (1983). Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 805-812.
- Pitt, R.E. (1993). A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *Journal of Food Protection* **56**: 139-146.
- Pitt, J.I. dan Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edn. Springer, New York.
- Rachmawati, S., Lee, A., Murdiati, T.B. dan Kennedy, I. (2004). Pengembangan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) teknik untuk analisis aflatoksin B₁ pada pakan ternak. *Prosiding Seminar Parasitologi dan Toksikologi Veteriner* 133-148.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. dan Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 2772-2777.
- Sa'ñchez, E., Heredia, N. dan Garcia, S. (2005). Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *International Journal of Food Microbiology* **98**: 271-279.
- Santoso, B., Kilmaskossu, A. dan Sambodo, P. (2007). Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Animal Feed Science and Technology* **137**: 58-68.
- Shih, C.N. dan Marth, E.H. (1974a). Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology* **27**: 452-456.
- Shih, C.N. dan Marth, E.H. (1974b). Aflatoxin formation, lipid synthesis, and glucose metabolism by *Aspergillus parasiticus* during incubation with and without agitation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **338**: 1286-296.
- Skočibušić, M., Bezić, N. dan Dunki, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry* **96**: 20-28.
- Sule, W.F., Okonko, I.O., Omo-Ogun, S., Nwanze, J.C., Ojezele, M.O., Ojezele, O.J., Alli, J.A., Soyemi, E.T. dan Olaonipekun, T.O. (2011). Phytochemical properties and *in vitro* antifungal activity of *Senna alata* Linn. crude stem bark extract. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**: 176-183.
- Tatsadjieu, N.L., Dongmo, P.M.J., Ngassoum, M.B., Etoa, F.X. dan Mbofung, C.M.F. (2009). Investigations on

- the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control* **20**: 161-166.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B. dan Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology* **145**: 464-470.
- U.S. Dairy Export Council (2005). *Reference Manual for U.S. Milk Powder*. Hal. 41.
- Yong, J.W.H., Ge, L., Ng, Y.F. dan Tan, S.N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L) water. *Molecules* **14**:5144-5164.
- Yu, J., Mohawed, S.M., Bhatnagar, D. dan Cleveland, T.E. (2003). Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 1334-1343.