

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) terhadap Aflatoksin B1 pada Jagung

Antioxidant Activity of *Andrographis paniculata* Leaves Extract and *Garcinia mangostana* Peel Extract to aflatoxin B1 in Corn

R S H Martin*, E B Laconi, A Jayanegara

Corresponding email:
rimashm@apps.ipb.ac.id

Departemen Ilmu Nutrisi dan
Teknologi Pakan Fakultas
Peternakan IPB University, Jl.
Agatis Kampus IPB Dramaga,
Bogor, Indonesia

Submitted: 12th September 2021
Accepted: 30th November 2021

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the active compound of *Garcinia mangostana* (GME) and *Andrographis paniculata* (APE) extracts and the effectiveness of these extracts against aflatoxin B1 (AFB1) which had contaminated corn. The experimental design of this study was a completely randomized factorial design. Factor A was the addition of extract, A0=without addition, A1=addition of 0.08% GME, A2=addition of 0.16% GME, A3=addition of 0.08% APE, A4=addition of 0.16% APE. Factor B was the incubation period, B1=day 0, B2=day-2, B3=day-4. The research variables were extract yield, total phenolic content, antioxidant activity, corn moisture content and gross energy, AFB1 content, production and percentage of inhibition of AFB1. The data obtained were analyzed for variance and Duncan's test. The results showed that GME and APE had yields of 16.68% and 5.49%, total phenolic content of 125.28 and 12.62 mg GAE g extract⁻¹ and antioxidant activity of 29.82 and >200 ppm respectively. The addition of extract to each treatment during incubation significantly interacted with AFB1 production. However, the gross energy in each treatment was only affected by the incubation time, while the moisture content increased on the second day to 13.29%. It can be concluded that the addition of 0.16% GME could inhibit the production of AFB1 which was higher than the addition of other extracts during incubation.

Key words: aflatoxin B1, *Andrographis paniculata*, corn, *Garcinia mangostana*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menganalisis zat aktif ekstrak daun sambiloto (EDS) dan ekstrak kulit manggis (EKM) serta keefektifan kedua ekstrak terhadap produksi aflatoksin B1 (AFB1) yang mengkontaminasi jagung. Rancangan penelitian yang digunakan oleh rancangan acak lengkap berpola faktorial. Faktor pertama adalah penambahan ekstrak, A0=tanpa penambahan ekstrak, A1=penambahan EKM 0,08%, A2=penambahan EKM 0,16%, A3=penambahan EDS 0,08%, A4=penambahan EDS 0,16%. Faktor kedua adalah periode inkubasi pada hari ke-0, ke-2 dan ke-4. Peubah penelitian adalah rendemen ekstrak, aktivitas antioksidan, kadar fenolik total, kadar air dan energi bruto jagung, kandungan, produksi serta persentase hambatan AFB1. Data yang diperoleh dianalisis sidik ragam dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun sambiloto dan ekstrak kulit manggis memiliki rendemen sebesar 16,68% dan 5,49%, kandungan fenolik total sebesar 125,28 dan 12,62 mg GAE g ekstrak⁻¹ serta aktivitas antioksidan sebesar 29,82 dan >200 ppm. Penambahan ekstrak pada setiap perlakuan selama inkubasi berinteraksi nyata terhadap produksi AFB1. Energi bruto pada setiap perlakuan hanya dipengaruhi oleh waktu inkubasi sedangkan kadar air mengalami peningkatan pada hari ke-2 menjadi 13,29%. Simpulan hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ekstrak kulit manggis sebanyak 0,16% dapat menghambat produksi AFB1 lebih tinggi dibandingkan penambahan ekstrak lainnya selama inkubasi.

Kata kunci: aflatoksin B1, jagung, manggis, sambiloto

PENDAHULUAN

Penyimpanan bahan pakan jagung menjadi perhatian khusus terutama di daerah dengan iklim tropis seperti Indonesia. Iklim Indonesia yang relatif lembab menjadikan cendawan mudah tumbuh pada jagung. Salah satu jenis kapang yang umumnya mengkontaminasi jagung adalah *Aspergillus flavus* yang menghasilkan senyawa mikotoksin berupa aflatoksin B1 (AFB1) (Aristyawati et al. 2017). Aflatoksin dapat menimbulkan gangguan pada hewan maupun manusia yang mengkonsumsinya karena bersifat karsinogenik dan dapat menurunkan produktivitas ternak (Liu & Wu 2010; Oliveira & Vasconcelos 2020).

Terdapat batasan kandungan aflatoksin yang bersumber dari biji-bijian pada ransum pakan ternak pada Standar Nasional Indonesia (SNI) yang dikeluarkan dalam rentang waktu tahun 2006 – 2013. Batasan aflatoksin pada ransum pakan ternak bervariasi antara 20 – 200 ppb. Cemaran aflatoksin menurut Giovati et al. (2014) juga mempengaruhi pada kegagalan vaksinasi yang berakibat pada kerentanan ternak, terutama unggas, terhadap penyakit dan pada kejadian yang parah akan menyebabkan kematian. Dampak yang sangat berbahaya dan cemaran yang banyak ditemukan di lapangan mengarah pada tindakan penanggulangan yang tepat. Salah satu caranya adalah mitigasi efek aflatoksin yang telah dikonsumsi ternak dengan peningkatan daya tahan tubuh dan pengurangan efek racun dengan antioksidan. Beberapa upaya pengendalian aflatoksin dilakukan secara langsung ataupun tidak langsung. Pengendalian tidak langsung melalui mengendalikan infeksi aflatoksin di ladang pertanian, industri pakan di gudang penyimpanan sedangkan pengendalian secara langsung melalui absorben, bahan kimia maupun biologik (Hasheminya & Dehghannya 2013; Widiastuti 2014).

Manggis (*Garcinia mangosta*) merupakan buah tropis yang banyak dibudidayakan di Asia Tenggara salah satunya Indonesia. Produksi manggis nasional pada tahun 2019 sebesar 246 ribu ton dengan limbah dua per tiga dari produksinya (Kementerian Pertanian 2019). Kulit manggis diketahui memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia. Penelitian ekstensif yang dilakukan oleh Suttirak & Manurakchinakorn (2014) terkait kandungan senyawa bioaktif kulit manggis menunjukkan bahwa terdapat beberapa senyawa berupa *phenolic acids* (*protocatechuic acid*, *p-coumaric acid*, *3,4-dihydroxymandelic acid*, *m-hydroxybenzoic acid*, *caffeic acid*, *veratric acid* dan *ferulic acid*), *flavonoid* (*anthocyanins*, *proanthocyanidins*, *(-)-epicatechin* dan *xanthenes*), *tannin* dan komponen bioaktif lainnya. Shan et al. (2011) menyatakan bahwa kulit buah manggis mempunyai fungsi sebagai antioksidan, antitumor, antialergi, anti-inflamatori, anti-jamur dan antibakteri. Selain kulit manggis, terdapat tanaman obat dengan manfaat sebagai penghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* untuk memproduksi aflatoksin, yaitu daun sambiloto (*Andrographis paniculata*). Penambahan

sambiloto sebesar 0,08% pada pakan itik yang tercemar AFB1 dapat menurunkan residu AFB1 dan aflatoksikol yang terbentuk di hati (Widiastuti 2014). Tanaman obat ini banyak ditemukan di Indonesia dan terdapat zat-zat aktif yang sangat berguna seperti *andrographolide*, *paniculides*, *farnesols*, *flavonoid*, *lactone*, *paniculin*, *kalmegin*, saponin, alkaloid dan tanin (Sawitti et al. 2013). Komponen zat aktif utama dari daun sambiloto adalah *andrographolide* (C₂₀H₃₀O₅) dan kadar yang terkandung pada tanaman dapat mencapai 4% dari bahan kering (Chao & Lin 2010).

Karakteristik kulit manggis dan daun sambiloto ini diduga berpotensi untuk mengatasi kerugian yang diakibatkan oleh cemaran aflatoksin pada jagung dan meningkatkan imunitas ternak. Penggunaan ekstrak daun sambiloto dan ekstrak kulit manggis diharapkan dapat menurunkan cemaran aflatoksin yang dihasilkan oleh kapang. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi dan menguraikan kandungan zat aktif pada kulit manggis dan daun sambiloto serta menguji keefektifan ekstrak daun sambiloto dan ekstrak kulit manggis terhadap produksi AFB1 pada jagung.

METODE

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah jagung giling halus, kulit manggis, daun sambiloto, *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) IPBCC 88 0106, methanol, asam galat, reagen Folin Ciocalteu, 2,2-difenil-pikril hidrazil (DPPH), NaHCO₃, asam askorbat, asam sulfat pekat, *potato dextrose agar* (PDA), aquades steril, parafilm, NaCl, alkohol 70%, aquades, kawat platina, air destilasi, oksigen 25 atm dan AflaTest. Alat yang digunakan berupa FATEX-S, spektrofotometer, pipet tetes, plat tetes, *autoclave*, inkubator, *syringe*, *bomb calorimeter*, gelas filter mikrofiber, AflaTest *affinity column*, mesin *high performance liquid chromatography* (HPLC) dan higrometer.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi kulit manggis dan daun sambiloto (AOAC 2005)

Tepung kulit manggis dan daun sambiloto masing-masing dimasukkan ke dalam selongsong kertas saring berkapas. Bobot labu ekstrak kosong (a) ditimbang dan selongsong dimasukkan ke dalam ruang ekstrak dan ditambahkan 250 mL metanol selama 24 jam. Larutan hasil ekstrak ditampung dalam labu ekstrak dan diambil beberapa buah labu ekstrak untuk diuapkan pelarutnya dan dikeringkan dalam oven 60°C. Labu ekstrak yang sudah kering (b) dihitung rendemennya. Persentase rendemen (%) dihitung melalui perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{b-a}{m} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot labu sebelum ekstraksi (gram)

b = bobot labu setelah ekstraksi (gram)

m = massa sampel (gram)

Sisa sampel yang masih bercampur dengan pelarut metanol dikeringkan menggunakan metode *spray dryer* untuk mengubah bentuk menjadi tepung.

Penentuan total phenolic content (TPC) (Singleton et al. 1999)

Larutan ekstrak disiapkan dengan konsentrasi 1 mg mL⁻¹ dengan pelarut metanol. Sebanyak 0,5 mL masing-masing larutan ekstrak diambil dan ditambahkan 2,5 mL reagen Folin Ciocalteu 10% serta 2,5 mL NaHCO₃ 7,5%. Larutan blanko disiapkan pula dari campuran 0,5 mL methanol dan pereaksi yang serupa dengan sampel. Sampel dan blanko diinkubasi pada suhu 45°C selama 45 menit lalu absorbansi diukur pada panjang gelombang 765 nm. Kurva standar disiapkan dari asam galat (*gallic acid equivalent* (GAE)) menggunakan prosedur yang serupa dengan sampel dengan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm dan 150 ppm. Kadar senyawa fenolik dapat dihitung melalui perhitungan sebagai berikut:

$$C = \frac{cV}{m}$$

Keterangan:

C = konsentrasi total fenolik (mg GAE g ekstrak⁻¹)

c = konsentrasi gallic acid (mg L⁻¹)

V = volume larutan ekstrak kulit manggis/ekstrak daun sambiloto dalam metanol (mL)

m = massa ekstrak kulit manggis/ekstrak daun sambiloto (g)

Uji aktivitas antioksidan metode DPPH (Aqil et al. 2006)

Sampel ekstrak dibuat dengan 6 seri konsentrasi yaitu 3,125 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25; 50 ppm; 100 ppm dan 200 ppm. Tiap sampel diambil sebanyak 2 mg lalu dilarutkan dalam 10 mL methanol sehingga konsentrasi larutan sebesar 200 ppm. Pengenceran bertingkat dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi lainnya. Sebanyak 1 mL larutan ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,1 mM (dalam metanol). Kontrol negatif disiapkan dari 2 mL DPPH 0,1 mM. Sampel dan kontrol negatif diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Kurva standar disiapkan dari asam askorbat menggunakan prosedur yang sama dalam konsentrasi larutan yang lebih rendah yaitu 1,25 ppm; 2,5 ppm; 5 ppm, 10 ppm dan 20 ppm. Persentase hambatan (%I) dihitung melalui perhitungan sebagai berikut:

$$\%I = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan:

*A*₀ = absorbansi kontrol negatif (nm)

A = absorbansi sampel (nm)

Nilai hambatan dan konsentrasi ekstrak diplot pada sumbu x dan y. Persamaan garis antara kedua variabel tersebut digunakan untuk menghitung *inhibitory concentration* 50% (IC₅₀).

Uji kualitatif flavonoid (Sangi et al. 2008)

Ekstrak kulit manggis dan daun sambiloto diambil masing-masing sebanyak satu sudip dan dilarutkan ke dalam metanol 1,5 mL kemudian dihomogenkan. Larutan ekstrak dipanaskan dalam *water bath* bersuhu 50°C selama 5 menit. Ekstrak diambil masing-masing sebanyak 5 tetes menggunakan pipet tetes dan dipindahkan ke dalam plat tetes lalu ditambahkan 5 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi berwarna merah.

Pembiakan dan transfer *A. flavus*

Potato dextrose agar (PDA) disiapkan sebanyak 1,1 g ke dalam labu Erlenmeyer dan ditambahkan 28 mL aquades steril. Larutan dipanaskan di atas api sambil diaduk hingga homogen dan dipindahkan 5 mL ke tabung reaksi serta ditutup dengan kapas. Larutan media disterilkan menggunakan *autoclave*. Media didinginkan dengan posisi tabung reaksi miring dan kultur *A. flavus* disiapkan. Setelah media terbentuk, kultur *A. flavus* dioleskan pada permukaan media. Media yang sudah dicampurkan dengan *A. flavus* ditutup dengan kapas dan parafilm dan disimpan di dalam inkubator selama 1 minggu hingga muncul hifa-hifa kapang *A. flavus* yang berwarna hijau kehitaman.

Kultur yang sudah tumbuh dicampurkan dengan air dan dikelupas secara perlahan menggunakan kawat ose untuk memisahkan jamur dari media secara perlahan tanpa merusak media. Kultur *A. flavus* dicampurkan pada 0,5 kg jagung secara merata. Jagung yang sudah tercemar diambil masing-masing 50 g dan ditambahkan aquades steril sebanyak 8 mL serta dicampurkan merata dengan 450 g jagung yang sudah disterilkan menggunakan *autoclave*. Jagung yang sudah tercampur disimpan pada plastik yang sudah diberi lubang sehingga terjadi sirkulasi udara dan diletakkan di ruang inkubasi. Selama inkubasi, suhu dan kelembaban ruangan inkubasi dicatat. Sampel dianalisis pada hari ke-0 dan dilakukan analisis lanjutan pada hari ke-2 dan hari ke-4. Pada saat pengambilan sampel, jagung diaduk merata dan diberi udara secara rutin.

Analisis energi bruto (AOAC 2005)

Jagung murni dimasukkan sebanyak 0,5 g ke cawan kecil. Kawat platina sepanjang 10 cm diletakkan di antara cawan dan dimasukkan ke dalam *bomb calorimeter*. Aquades ditambahkan sedikit ke dalam *bomb calorimeter* dan diisi 25 atmosfer gas oksigen. *Bomb calorimeter* diletakkan ke dalam wadah yang sudah berisi air dan ditutup. Suhu diatur dengan memutar tombol lalu dicatat sebagai suhu awal (a). Sampel dibakar dengan menekan *knop* lalu didiamkan selama 5 menit. Suhu distabilkan kembali dengan menekan tombol suhu. Suhu stabil dicatat sebagai suhu akhir (b). Cawan serta tabung *bomb calorimeter* dibilas dengan larutan campuran aquades dan indikator *methyl orange*. Air bilasan dititrasi dengan Na₂CO₃. Kawat platina yang terbakar diukur sebagai (k)

kalori. Nilai energi bruto (EB) jagung dapat diperoleh melalui perhitungan sebagai berikut:

$$EB = \frac{(b-a) \times w - k \times t_i \times 10^{-3}}{m \times 10^{-3}}$$

Keterangan:

b = suhu akhir (°F)

a = suhu awal (°F)

k = kawat platina terbakar (kalori)

t_i = volume Na₂CO₃ yang digunakan untuk mencapai titik akhir titrasi (mL)

w = 2589 (water equivalent)

m = massa sampel (g)

Analisis kadar air (AOAC 2005)

Cawan ditimbang dan sampel ditimbang sebanyak 1 g (a) lalu timbang cawan yang sudah berisi sampel (b). Sampel dimasukkan ke dalam oven 135°C selama dua jam. Setelah dua jam, sampel dimasukkan ke dalam eksikator dan ditimbang kembali bobot cawan serta sampel (c). Data yang didapatkan merupakan data kadar air 135°C. Kadar air (KA) dihitung melalui perhitungan sebagai berikut:

$$KA = \frac{b-c}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = massa sampel (g)

b = massa sampel dan cawan sebelum dimasukkan ke oven 135°C (g)

c = massa sampel dan cawan setelah dimasukkan ke oven 135°C (g)

Analisis aflatoksin (AOAC 2005)

Uji aflatoksin pada jagung dilakukan dengan menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Sampel diambil sebanyak 50 g dan dicampur dengan 5 g NaCl. Campuran tersebut dihomogenkan dengan metanol 80% menggunakan *blender* selama satu menit. Ekstrak yang dihasilkan disaring menggunakan kertas saring dan ditampung di gelas ukur. Ekstrak yang tersaring diambil sebanyak 10 mL lalu dilarutkan dengan 40 mL aquades. Ekstrak disaring kembali dengan menggunakan kertas saring mikrofiber ke dalam tabung penampung. 10 mL ekstrak dan 10 mL aquades dilalui melalui AflaTest *affinity column* dengan kecepatan 1-2 tetes per detik hingga udara keluar dari kolom. Kuvet diletakkan dibawah kolom. Kolom AflaTest dibersihkan menggunakan 1 mL metanol HPLC dengan kecepatan 1 tetes per detik dan sampel dikumpulkan di dalam kuvet sebanyak 1 mL. Sampel dicampurkan dengan aquades HPLC lalu dimasukkan ke dalam mesin HPLC. Pada mesin HPLC, fase pergerakan kolom menggunakan pelarut metanol dan aquades dengan perbandingan 45:55. Kecepatan aliran pada kolom sebesar 1,0 ml menit⁻¹ dan pendeteksi *fluorescence* pada gelombang 360 nm. Data analisis dihitung produksi aflatoksin dan persentase hambatan. Cara perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Produksi aflatoksin } B1 = a - b$$

Keterangan:

a = kadar aflatoksin hari ke-4 (ppb)

b = kadar aflatoksin hari ke-0 (ppb)

$$\text{Persentase hambatan} = \frac{c-d}{c} \times 100\%$$

Keterangan:

c = kadar aflatoksin kontrol (ppb)

d = kadar aflatoksin perlakuan (ppb)

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan acak lengkap faktorial digunakan pada parameter kadar AFB1, kadar air dan energi bruto sedangkan parameter lainnya dijelaskan secara deskriptif. Faktor pertama adalah penambahan ekstrak, A0 = kontrol (tanpa penambahan ekstrak), A1 = penambahan EKM 0,08%, A2 = penambahan EKM 0,16%, A3 = penambahan EDS 0,08%, A4 = penambahan EDS 0,16%. Faktor kedua adalah periode inkubasi pada hari ke-0 dan ke-4. Peubah penelitian adalah rendemen ekstrak, aktivitas antioksidan, kadar fenolik total, kadar air dan energi bruto jagung, kandungan, produksi serta persentase hambatan. Uji Duncan digunakan jika terdapat perbedaan nyata pada perlakuan. Data dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA).

Perlakuan penelitian menggunakan taraf pemberian ekstrak daun sambiloto dan ekstrak kulit manggis yang berbeda dengan masa inkubasi 4 hari yaitu 0% ekstrak, penambahan 0,08% ekstrak kulit manggis, penambahan 0,16% ekstrak kulit manggis, penambahan 0,08% ekstrak daun sambiloto dan penambahan 0,16% ekstrak daun sambiloto.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Uji Zat Aktif

Hasil ekstraksi yang ditampilkan pada Tabel 1 menunjukkan kulit manggis dan daun sambiloto menghasilkan rendemen sebesar 16,68% dan 5,49%. Hal ini menunjukkan bahwa kulit manggis memiliki zat aktif lebih banyak dibandingkan daun sambiloto. Menurut Dungir *et al.* (2012), persen rendemen ekstrak kulit manggis berkisar antara 15,50% - 21,00% dan hasil uji menunjukkan hasil berada pada kisaran tersebut. Wikantyasning *et al.* (2009) menyebutkan rendemen ekstrak daun sambiloto sebesar 3,30%. Perbedaan hasil rendemen ekstrak daun sambiloto dengan penelitian sebelumnya dipengaruhi beberapa faktor diantaranya pelarut dan ukuran partikel (Dyahnugra & Widjarnako 2015).

Penggunaan pelarut metanol menandakan bahwa pelarut polar lebih mudah memisahkan zat aktif dengan zat lainnya pada bahan sehingga zat aktif yang terpisah

Tabel 1 Persentase rendemen dan kandungan zat aktif

Jenis Ekstrak	Rendemen (%)	TPC (mg GAE g ekstrak ⁻¹)	IC ₅₀ (ppm)
Kulit manggis	16,68±0,56	125,28±0,88	29,82±0,09
Daun sambiloto	5,49±1,25	12,62±0,22	>200

Tabel 2 Uji kualitatif flavonoid

Jenis Ekstrak	Warna	
	Sebelum Pengujian	Sesudah Pengujian
Kulit manggis	Jingga	Merah marun
Daun sambiloto	Hijau tua	Merah kehitaman

semakin banyak dan mengakibatkan rendemen hasil ekstraksi menjadi meningkat. Ukuran partikel yang kecil mengakibatkan kontak antara sampel dengan pelarut semakin besar sehingga ekstraksi semakin optimal. Ukuran partikel yang kecil pada penelitian juga mempengaruhi tingginya persen rendemen.

Kandungan fenolik total pada ekstrak kulit manggis dan ekstrak daun sambiloto sebesar 125,28 dan 12,62 mg GAE g ekstrak⁻¹. Tingginya kadar fenolik total pada ekstrak kulit manggis dipengaruhi oleh kandungan fenol kulit manggis yang dapat larut pada larutan metanol lebih tinggi dibandingkan daun sambiloto. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa kandungan fenolik total pada ekstrak kulit manggis dan ekstrak daun sambiloto sebesar 141,84 dan 6,02-7,63 mg GAE g ekstrak⁻¹ (Dungir et al. 2012; Budiarti 2015). Perbedaan ini dimungkinkan karena perbedaan jenis kulit manggis dan daun sambiloto, kondisi ekstraksi, dan metode ekstraksi.

Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi zat antioksidan yang memberikan persentase penghambatan sebesar 50%. Nilai IC₅₀ yang kecil sebagai indikator bahan yang digunakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat serta penggunaan ekstrak dalam menghambat 50% aktivitas radikal bebas semakin sedikit. Nilai IC₅₀ yang baik pada suatu bahan adalah nilai IC₅₀ yang bernilai kecil. Hal ini menunjukkan bahwa bahan memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan jamur dengan penggunaan jumlah sedikit. Ekstrak kulit manggis bernilai IC₅₀ sebesar 29,82 ppm sedangkan nilai IC₅₀ ekstrak daun sambiloto lebih besar dari 200 ppm. Nilai IC₅₀ yang sangat besar pada ekstrak daun sambiloto menunjukkan bahwa ekstrak tersebut kurang efektif karena

kemampuan menghambat dapat dilakukan dengan menggunakan dalam jumlah yang banyak. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kulit manggis lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun sambiloto. Menurut Pangestu et al. (2017), terdapat lima kategori antioksidan, yaitu sangat kuat (<50 ppm), kuat (50-100 ppm), sedang (101ppm -150 ppm), lemah (151 ppm -200 ppm) dan sangat lemah (>200 ppm).

Berdasarkan Tabel 1, ekstrak kulit manggis dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat sedangkan ekstrak daun sambiloto dapat dikategorikan antioksidan sangat lemah. Senyawa zat aktif berupa flavonoid berpotensi sebagai antioksidan. Flavonoid banyak ditemukan di tumbuhan dan jumlahnya bervariasi tergantung jenis tanamannya. Secara umum, flavonoid dapat dideteksi dengan warna merah. Tabel 2 menunjukkan hasil uji kualitatif flavonoid pada ekstrak kulit manggis dan ekstrak daun sambiloto.

Ekstrak kulit manggis berwarna jingga sebelum diberi perlakuan dan berubah menjadi merah marun setelahnya. Perubahan warna juga terjadi pada ekstrak

Tabel 3 Rata-rata suhu dan kelembaban inkubator

Peubah	Hari ke-			Rataan
	0	2	4	
Suhu (°)	28,00±0,50	27,80±0,56	27,80±0,36	27,85±0,42
Kelembaban (%)	80,00±0	80,67±0,58	80,33±0,58	80,47±0,52

daun sambiloto. Ekstrak daun sambiloto yang berwarna hijau menjadi berwarna merah kehitaman. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar flavonoid pada ekstrak akan menunjukkan warna merah yang semakin pekat (Rochmat 2015). Warna merah yang muncul menandakan adanya kandungan flavonoid. Hal ini dikarenakan reduksi oleh asam klorida pekat serta magnesium yang terkandung pada ekstrak setelah perlakuan (Lumbessy et al. 2008).

Efektifitas Ekstrak Kulit Manggis dan Ekstrak Daun Sambiloto terhadap AFB1

Pertumbuhan jamur *A. flavus* dan produksi aflatoxin sangat bergantung pada beberapa faktor seperti suhu dan kelembaban inkubator, kadar air, dan aktivitas air pada jagung. Tabel 3 menunjukkan kondisi suhu dan kelembaban inkubator selama perlakuan empat hari.

Rataan suhu dan kelembaban selama perlakuan empat hari adalah 27,85°C dan 80,47%. Kondisi ini menunjukkan bahwa kondisi inkubator selama penyimpanan relatif lembab. Kondisi optimum yang dapat mempengaruhi *A. flavus* memproduksi aflatoxin adalah dalam rentang 10°C-31°C dan kelembaban minimal 80% (Jaibangyang et al. 2021). Kondisi pada masa inkubasi sudah berada pada suhu dan kelembaban yang optimum sehingga *A. flavus* dapat memproduksi aflatoxin pada penelitian ini.

Kadar air pada masa inkubasi juga berpengaruh pada aktivitas *A. flavus*. Kadar air jagung dan perlakuan pada masa inkubasi ditunjukkan pada Tabel 4. Jagung kontrol dan perlakuan tidak berpengaruh pada peningkatan kadar air pada jagung. Interaksi antar perlakuan dan periode pengamatan tidak berpengaruh nyata terhadap kadar air pada jagung. Namun, peningkatan kadar air pada jagung kontrol dan perlakuan dipengaruhi oleh periode pengamatan ($p < 0,01$). Hal ini disebabkan karena adanya penambahan air setelah perhitungan kadar air hari ke-0 dan kondisi penyimpanan yang relatif lembab sehingga menyebabkan peningkatan kadar air (Mukun et al. 2018). Penambahan air dilakukan untuk menciptakan kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan *A. flavus*. Peningkatan kadar air terjadi sejak dari awal hingga hari ke-2 pengamatan sedangkan peningkatan kadar air pengamatan tidak terlalu berpengaruh pada hari ke-4.

Keefektifan ekstrak daun sambiloto dan ekstrak kulit manggis dalam menghambat pembentukan aflatoxin diukur pada jagung kontrol dan perlakuan setelah empat hari inkubasi. Pada Tabel 5 menunjukkan bahwa interaksi penambahan ekstrak daun sambiloto dan ekstrak kulit manggis pada jagung dengan periode

Tabel 4 Kadar air pada jagung

Perlakuan	Hari ke-			Rataan
	0	2	4	
A0	12,36±0,12	13,37±0,43	13,39±0,24	13,04±0,57
A1	12,43±0,15	13,24±0,27	13,30±0,20	12,99±0,46
A2	12,86±0,13	13,38±0,20	13,26±0,43	13,17±0,35
A3	12,46±0,13	13,06±0,47	13,34±0,46	12,95±0,51
A4	12,73±0,32	13,39±0,23	13,15±0,42	13,09±0,41
Rataan	12,57±0,25 ^a	13,29±0,31 ^b	13,29±0,32 ^b	

A0=Jagung + *A. flavus*, A1=A0 + EKM 0,08%, A2=A0 + EKM 0,16%, A3=A0 + EDS 0,08%, A4=A0 + EDS 0,16%. EKM=Ekstrak Kulit Manggis, EDS=Ekstrak Daun Sambiloto. Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (p < 0,01)

pengamatan memberikan pengaruh sangat nyata (p<0,01) terhadap produksi AFB1. Jagung kontrol pada hari ke 0 mengandung kandungan AFB1 tertinggi sedangkan jagung dengan penambahan ekstrak kulit manggis 0,16% memiliki kandungan rata-rata AFB1 paling rendah sebesar 0,18 ppb. Jagung kontrol mengalami kenaikan kandungan AFB1 tertinggi sejak hari ke-2 dan terus mengalami kenaikan hingga hari ke-4 sedangkan pada jagung dengan penambahan ekstrak kulit manggis 0,16% memproduksi AFB1 terendah pada hari ke-2 dan ke-4 serta masih dimungkinkan adanya penghambatan produksi AFB1 oleh *A. flavus*.

Pada Tabel 5 terlihat jagung dengan ekstrak kulit manggis 0,08%, ekstrak daun sambiloto 0,08% dan ekstrak daun sambiloto 0,16% mengalami peningkatan produksi AFB1, tetapi nilai peningkatan AFB1 pada jagung dengan ekstrak manggis 0,08% lebih rendah dibandingkan jagung dengan ekstrak daun sambiloto pada hari ke-2. Penambahan ekstrak daun sambiloto dengan dosis yang berbeda pada jagung menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak (0,16%) maka kenaikan produksi AFB1 semakin kecil. Pada hari ke-4, produksi AFB1 oleh *A. flavus* pada ketiga perlakuan jagung tersebut tidak terhambat secara nyata. Hal ini dimungkinkan karena keefektifan ekstrak kulit manggis 0,08% dan ekstrak daun sambiloto hanya mampu menghambat produksi AFB1 selama 2 hari inkubasi sedangkan ketiga ekstrak tersebut kurang mampu menghambat produksi AFB1 pada masa inkubasi 4 hari. Peningkatan kadar aflatoxin pada hari ke-4 di jagung dengan penambahan ekstrak kulit manggis 0,08%, ekstrak daun sambiloto 0,08% dan ekstrak daun sambiloto 0,16% diduga karena senyawa aktif pada ekstrak telah habis atau tidak mampu

menghambat sementara kapang terus tumbuh dan memproduksi AFB1. Selain itu, kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan ekstrak daun sambiloto pada penelitian ini termasuk kategori lemah sehingga tidak dapat menekan produksi AFB1. Masa inkubasi mempengaruhi produksi AFB1 oleh *A. flavus* (p<0,01). Pengamatan inkubasi selama 4 hari berdampak pada peningkatan kadar AFB1 pada jagung. Pada hari ke-0, kadar aflatoxin berkisar pada 0,39 ppb dan terus meningkat hingga hari ke-4 sebesar 0,77 ppb. Perlakuan penambahan ekstrak pada jagung juga berpengaruh pada masa inkubasi (p<0,01). Penambahan dosis ekstrak yang semakin tinggi akan menekan produksi AFB1 oleh *A. flavus* sehingga AFB1 yang dihasilkan juga menurun. Selama masa inkubasi, *A. flavus* memproduksi AFB1 dan persentase hambatan produksi yang berbeda pada jagung kontrol dan perlakuan. Hasil produksi dan hambatan produksi AFB1 ditunjukkan pada Tabel 6.

Produksi aflatoxin dihitung dari selisih kadar aflatoxin hari ke-4 dan hari ke-0. Nilai produksi AFB1 dari setiap perlakuan kemudian dihitung sebagai persentase hambatan. Pembentukan AFB1 pada jagung kontrol lebih tinggi dibandingkan jagung perlakuan sebesar 1,04 ppb. Hal ini dikarenakan jagung tidak mengalami penghambatan apapun selama inkubasi.

Jagung perlakuan yang menunjukkan produksi AFB1 lebih rendah dibandingkan jagung kontrol. Produksi AFB1 terendah dan persentase hambatan ekstrak tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak kulit manggis 0,16% sebesar 0,15 ppb dan 85,53%. Nilai hambat pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa zat aktif berperan sangat nyata terhadap pertumbuhan *A. flavus*. Zat aktif berupa

Tabel 5 Kadar AFB1 pada jagung

Perlakuan	Hari ke-		
	0	2	4
A0	0,49±0,04 ^{ef}	0,55±0,02 ^{fg}	1,53±0,07 ⁱ
A1	0,39±0,05 ^{cd}	0,43±0,07 ^{de}	0,60±0,03 ^e
A2	0,18±0,01 ^a	0,26±0,02 ^b	0,33±0,07 ^{bc}
A3	0,48±0,03 ^{def}	0,58±0,05 ^g	0,74±0,05 ^h
A4	0,41±0,02 ^{cde}	0,47±0,06 ^{de}	0,63±0,05 ^g

Tabel 6 Produksi dan persentase AFB1 hambatan produksi

Peubah	Perlakuan				
	A0	A1	A2	A3	A4
Produksi (ppb)	1,04±0,05	0,20±0,03	0,15±0,06	0,27±0,02	0,22±0,05
Hambatan produksi (%)	0±0,00	80,39±2,90	85,53±3,93	74,28±1,45	78,78±3,48

Tabel 7 Energi bruto pada jagung

Perlakuan	Hari ke-			Rataan
	0	2	4	
	-----kcal kg ⁻¹ -----			
A0	3839,56±13,22	3830,33±44,94	3825,61±24,60	3831,83±27,16
A1	3981,78±134,02	3808,57±19,58	3848,55±39,24	3879,63±105,54
A2	3915,98±204,27	3806,44±107,41	3838,53±27,66	3853,65±126,03
A3	4125,76±121,48	3811,69±34,51	3846,57±25,12	3928,01±162,39
A4	3978,33±210,09	3820,97±22,25	3844,80±27,85	3881,37±129,41
Rataan	3968,28±162,72 ^b	3815,60±48,13 ^a	3840,81±26,28 ^a	

A0=Jagung + *A. flavus*, A1=A0 + EKM 0,08%, A2=A0 + EKM 0,16%, A3=A0 + EDS 0,08%, A4=A0 + EDS 0,16%. EKM=Ekstrak Kulit Manggis, EDS=Ekstrak Daun Sambiloto. Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata $p < 0,01$.

flavonoid menghambat kapang dengan cara memasuki sel *A. flavus* melalui lubang pada membran sel yang terbentuk karena senyawa fenol ekstrak telah mendenaturasi lipid membran sel. Senyawa protein pada *A. flavus* tersebut akan terdenaturasi oleh flavonoid melalui ikatan hidrogen. Flavonoid mengikat protein dan menyebabkan pembentukan dinding sel *A. flavus* terhambat sehingga hifa yang terdapat pada dinding sel juga terhambat (Dani et al. 2012). Nilai hambatan yang tinggi pada jagung dengan ekstrak kulit manggis 0,16% dikarenakan tingginya kandungan fenol dan aktivitas antioksidan sehingga dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus* untuk memproduksi AFB1.

Persentase hambatan terendah di antara penambahan ekstrak adalah perlakuan jagung dengan penambahan ekstrak daun sambiloto 0,08% dengan nilai sebesar 74,28%. Hal ini disebabkan kandungan fenolik yang lebih rendah dan aktivitas antioksidan yang kurang kuat pada ekstrak daun sambiloto dibandingkan ekstrak kulit manggis. Selain itu, kadar ekstrak yang diberikan hanya 0,08% menyebabkan kemampuan ekstrak untuk menghambat pertumbuhan *A. flavus* untuk memproduksi AFB1 lebih rendah (Maleki et al. 2008; Noveriza & Miftakhuromah 2010). Rachmawati et al. (1998) menyebutkan bahwa penambahan daun sambiloto 0,16% dapat menurunkan AFB1 hingga 45,39%. Peningkatan pada penelitian ini diduga karena adanya penambahan ekstrak sehingga zat aktif bekerja lebih maksimal untuk menurunkan produksi AFB1. Pertumbuhan *A. flavus* pada jagung akan mengubah kandungan energi bruto pada jagung. Hal ini disebabkan energi pada jagung digunakan oleh kapang untuk membentuk hifa dan komponen lain dari dinding sel kapang.

Kontaminasi *A. flavus* pada jagung diduga dapat menurunkan kandungan nutriennya, terutama pada kandungan energi bruto. Tabel 7 menunjukkan kandungan energi dari jagung kontrol dan perlakuan selama empat hari masa inkubasi. Kandungan rata-rata energi bruto tidak dipengaruhi nyata oleh penambahan ekstrak, tetapi penurunannya dipengaruhi oleh periode inkubasi ($p < 0,01$). Penurunan signifikan terjadi dari hari ke-0 hingga hari ke-2 inkubasi. Penurunan yang terjadi dimungkinkan karena pertumbuhan *A. flavus*

yang meningkat pada hari ke-2. Peningkatan *A. flavus* dikarenakan adanya penambahan air pada hari ke-0 dan penambahan ini diduga memicu pertumbuhan *A. flavus* yang lebih banyak. Kadar air yang lebih tinggi pada hari ke-2 menjadikan jagung media untuk tumbuhnya *A. flavus*. *A. flavus* memproduksi enzim ekstraselular hidrolitik untuk menguraikan pati yang ada di jagung untuk pertumbuhannya sehingga terjadi penurunan energi bruto jagung (Duran et al. 2014).

SIMPULAN

Rendemen, akivitas antioksidan dan kandungan fenolik total ekstrak kulit manggis lebih besar dari ekstrak daun sambiloto dengan nilai 16,68%, 29,82 ppm dan 125,28 mg GAE g ekstrak⁻¹. Interaksi antara pemberian ekstrak dan waktu inkubasi berpengaruh pada kadar AFB1 yang dihasilkan. Jagung dengan penambahan 0,16% ekstrak kulit manggis mengandung AFB1 dan menghambat AFB1 sebesar 0,15 ppb dan 85,53%. Kadar energi bruto pada penelitian dipengaruhi oleh waktu inkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2005. *Official Methods of Analyses* (17th ed.). Washington DC (US): Association of Official Analytical Chemists.
- Aqil F, Ahmad I & Mehmood Z. 2006. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*. 30:177-183.
- Aristyawati NPD, Puspawati NN, A NMIH & Duniaji AS. 2017. Cemaran *Aspergillus flavus* penghasil aflatoxin B1 pada jagung manis (*Zea mays saccharata*) selama penyimpanan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 6(2):51 - 60.
- Budiarti LA. 2015. Perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) asal Ciampea dan Cikabayan Bogor [skripsi]. Bogor (ID): Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Chao WW & Lin BF. 2010. Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Chinese Medicine*. 5(17):1-15.
- Dani IW, Nurtjahja K & Zuhra CF. 2012. Penghambatan pertumbuhan *Aspergillus flavus* dan *Fusarium moniliforme* oleh ekstrak salam (*Eugenia polyantha*) dan kunyit (*Curcuma domestica*). *Saintia Biologi*. 1(1):21-28.
- Dungir SG, Katja DG & Kamu VS. 2012. Aktivitas antioksidan ekstrak fenolik dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE*. 1(1):11 - 15.

- Duran RM, Gregersen S, Smith TD, Bhetariya PJ, Cary JW, Harris-Coward PY, Mattison CP, Grimm C & Calvo AM. 2014. The role of *Aspergillus flavus* *veA* in the production of extracellular proteins during growth on starch substrates. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 98(11):5081 – 5094.
- Dyahnugra AA & Widjarnako SB. 2015. Pemberian ekstrak bubuk simplisia kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) menurunkan kadar glukosa darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan kondisi hiperglikemik. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(1):113 – 123.
- Giovati L, Gallo A, Masoero F, Cerioli C, Ciociola T, Conti S, Magliani W & Polonelli L. 2014. Vaccination of heifers with anaflatoxin improves the reduction of aflatoxin B1 carry over in milk of lactating dairy cows. *PLoS One*. 9(4):e94440.
- Hasheminya SM & Dehghannya J. 2013. Strategies for decreasing aflatoxin in livestock feed and milk. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*. 4(6):1506 – 1510.
- Jaibangyang S, Nasanit R & Limtong S. 2021. Effects of temperature and relative humidity on Aflatoxin B1 reduction in corn grains and antagonistic activities against aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by a volatile organic compound-producing yeast, *Kwoniella heveanensis* DMKU-CE82. *BioControl*. 66:433 – 443.
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2019. Data lima tahun terakhir [internet]. [diacu 2021 Agustus 23]. Tersedia dari: www.pertanian.go.id
- Liu Y & Wu F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspective*. 118(6):818 – 824.
- Lumbessy M, Abidjulu J & Paendong JJE. 2013. Uji total flavonoid pada beberapa tanaman obat tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE*. 2(1):50 – 55.
- Maleki S, Seyyednejad SM, Damabi MN & Motamedi H. 2008. Antibacterial activity of the fruits of Iranian *Torilis leptophylla* against some clinical pathogens. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(9):1286-1289.
- Mukkun L, Lalel HJ & Tandirubak Y. 2018. Initial moisture content of corn cobs plays an important role in maintaining its quality during storage. *Agritech*. 38(2):167 – 171.
- Noveriza R & Miftakhurohmah. 2010. Efektivitas ekstrak metanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dan daun jeruk purut (*Cytrus histrix*) sebagai antijamur pada pertumbuhan *Fusarium oxysporum*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 16(1):6-11.
- Oliveira M & Vasconcelos V. 2020. Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: a review. *Toxins*. 12(3):160 – 185.
- Pangestu NS, Nurhamidah & Elvinawati. 2017. Aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak daun *Jatropha gossypifolia* L. *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 1(1):15 – 19.
- Rachmawati S, Arifin Z & Zahari P. 1998. Sambiloto (*Andrographis paniculata* N.) untuk mengurangi cemaran aflatoksin pada pakan ayam komersial. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 4(1):65-70.
- Rochmat A. 2015. Karakterisasi senyawa flavonoid ekstrak sambiloto (*Andrographis Paniculata*) yang mempunyai aktivitas inhibisi terhadap enzim siklooksigenase-2 secara *in vitro*. *Jurnal Integrasi Proses*. 5(2):81 – 87.
- Sangi M, Runtuwene MRJ, Simbala HEI & Makang VMA. 2008. Analisis fitokimia tumbuhan obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*. 1(1):47-53.
- Sawitti MY, Mahatmi H & Besung INK. 2013. Daya hambat perasan daun sambiloto terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Indonesia Medicus Veterinus*. 2(2):142 – 150.
- Shan T, Ma Q, Guo K, Liu J, Li W, Wang F & Wu E. 2011. Xanthones from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: Potential anticancer drugs. *Current Molecular Medicine*. 11(8):666 – 677.
- Singleton VL, Orthofer R & Lamuela-Raventors RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Volume 299. *Oxidants and Antioxidants Part A*. Orlando (US): Academic Press Orlando. Halaman 152-178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- Suttirak W & Manurakchinakorn S. 2014. In vitro antioxidant properties of mangosteen peel extract. *Journal of Food Science and Technology*. 51(12):3546 – 3558.
- Widiastuti R. 2014. Residu aflatoksin dan metabolitnya pada berbagai produk pangan asal hewan dan pencegahannya. *Wartazoa*. 24(4):179 – 190.
- Wikantyasning EDR, Nurwaini S, Wilisa OY & Mohandani IP. 2009. Formulasi tablet *effervescent* ekstrak herba sambiloto (*Andrographis apiculata* (Burm. f.) Nees) dan daun dewandaru (*Eugenia uniflora* Linn.): uji sifat fisik dan respon rasa. *PHARMACON*. 1(1):1-6.