

## Pengaruh Komposisi Asam Benzoat Dan Asam Salisilat Pada Pertumbuhan dan Produksi Aflatoksin *Aspergillus Flavus* Pada Buah Jagung (*Zea mays* L.)

Irma Ratna Kartika, Stefanus, dan Tri Handayani Kurniati

Jurusan Kimia dan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Kampus B UNJ, Jl. Pemuda No. 10 Rawamangun Jakarta 13220.

Corresponding author: [irmaratna@unj.ac.id](mailto:irmaratna@unj.ac.id)

### Abstrak

Kontaminasi aflatoksin pada bahan makanan dan biji-bijian merupakan masalah di seluruh dunia. Aflatoksin yang merupakan metabolit sekunder beracun yang diproduksi oleh *Aspergillus flavus*, bersifat karsinogen bagi hewan dan manusia, terutama sebagai penyebab kanker hati pada manusia. Pengaruh komposisi 11 campuran asam benzoat dan asam salisilat terhadap pertumbuhan dan produksi *A. flavus* pada jagung dilakukan dengan pengukuran pertumbuhan miselia, diameter koloni dan kandungan aflatoksin menggunakan HPLC. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa campuran asam benzoat dan asam salisilat dengan perbandingan 1:1 (masing-masing konsentrasi asam adalah 2,5 mg/25 mL dalam air) dan waktu kontak 30 menit, dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus* (9,16 mm/hari) dan produksi aflatoksin (872,88 ppb). Hasil ini dibandingkan terhadap standar fungisida (Mancozeb) dengan konsentrasi 5,0 mg/25 mL air, yang menunjukkan daya hambat yang lebih baik dengan kecepatan pertumbuhan *A. flavus* sebesar 8,08 mm/hari dan produksi aflatoksin sebanyak 596.22 ppb.

Kata kunci : *Aspergillus flavus*, aflatoksin, asam salisilat, asam benzoat, jagung.

### Abstract

Contamination of food and feed grains by aflatoxins is a problem throughout the world. Aflatoxins, which are toxic secondary metabolites produced by *Aspergillus flavus* are potent carcinogens to animals and have been linked to liver cancer in humans. The influence of 11 benzoic acid and salicylic acid composition on growth and aflatoxin production of *A. flavus* on maize was done by observing the miselial growth through the measurement of colony diameter and the measurement of aflatoxin content using the High Performance Liquid Chromatography method. The result showed that benzoic acid and salicylic acid on the composition of 2.5:2.5 mg/25 mL of distilled water with a contact time of 30 minutes showed the best inhibitory effect on growth and aflatoxin production of *A. flavus* with a growth rate of 9.16 mm / day and 872.88 ppb aflatoxin content, while the positive control Mancozeb 5.0 mg/25 mL of distilled water showed a better inhibitory effect with the growth rate of 8.08 mm/day and 596.22 ppb of aflatoxin content.

Keywords : *Aspergillus flavus*, aflatoxin, salicylic acid, benzoic acid, corn.

### 1. Pendahuluan

Jagung (*Zea mays* L.) adalah salah satu bahan makanan pokok yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia karena kandungan karbohidratnya yang tinggi, yaitu 70,3-76,3 gram karbohidrat per 100 gram bahan. Konsumsi jagung di Indonesia mencapai 16,32 juta ton pada tahun 2008 dan meningkat menjadi 17,66 juta ton pada tahun 2009. Jagung termasuk jenis bahan pangan yang mudah rusak dan terserang kontaminasi fungi. Kontaminasi

fungi pada jagung menyebabkan kerugian ekonomi di Asia yang mencapai US\$ 400 juta setiap tahunnya [1,2].

*Aspergillus flavus* merupakan salah satu jenis fungi yang menjadi kontaminan pada jagung. Jenis fungi ini tidak hanya mampu mengkontaminasi jagung, tetapi juga mampu memproduksi metabolit sekunder beracun yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan, yaitu aflatoksin. Kandungan aflatoksin pada jagung di Indonesia cukup tinggi, yaitu mencapai 50,81 ppb dengan tingkat kejadian 93,75 %,

melewati batas kandungan aflatoksin yang ditetapkan FDA, yaitu tidak lebih dari 20 ppb [3,4].

Aflatoksin merupakan senyawa metabolit sekunder dari fungi genus *Aspergillus* yang bersifat karsinogenik. Beberapa strategi biologis, kimiawi, dan fisika telah dilakukan untuk mencegah kerusakan komoditas pertanian dan bahan pangan dari serangan fungi *A. flavus* dan kontaminasi aflatoksin yang dihasilkan fungi tersebut. Akhir-akhir ini, senyawa fenolik alam sebagai inhibitor pertumbuhan dan produksi toksin fungi banyak digunakan seperti asam kafeat dan asam vanilat mampu menghambat pertumbuhan dan produksi mikotoksin *A. flavus* dan *Fusarium verticillioides* pada buah jagung [5].

Senyawa fenolik lain yang telah lama digunakan sebagai bahan pengawet karena memiliki sifat bakteriostatik dan antifungal yang mampu menghambat pertumbuhan dan produksi aflatoksin *A. flavus* pada medium cair, adalah asam salisilat [6]. Selain asam salisilat, asam organik lain yang juga telah lama digunakan sebagai pengawet pada bahan makanan dan memiliki efek antifungal terhadap *A. flavus* adalah asam benzoat [7].

Penelitian mengenai efek aditif campuran asam benzoat dan asam salisilat pada pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* telah dilaporkan [8]. Namun, penelitian mengenai efek aditif asam benzoat dan asam salisilat terhadap pertumbuhan dan produksi aflatoksin *A. flavus* serta aplikasi asam benzoat dan asam salisilat pada buah jagung untuk menghambat pertumbuhan dan produksi aflatoksin *A. flavus* belum pernah dilakukan. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa campuran kedua asam tersebut pada komposisi tertentu memiliki efek aditif untuk menghambat pertumbuhan fungi *A. flavus* pada buah jagung. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai komposisi optimum dari asam benzoat dan asam salisilat dalam menghambat serangan fungi *A. flavus* pada jagung. Penelitian

ini diharapkan dapat bermanfaat bagi bidang pertanian dan perkebunan, yaitu untuk memberikan informasi mengenai bahan pengawet dan fungisida yang relatif tidak beracun bagi manusia maupun hewan-hewan ternak dan dapat memperpanjang masa simpan buah jagung.

## 2. Metodologi Penelitian

### a. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *A. flavus* UICC 360 yang didapatkan atas kemurahan hati Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Indonesia dan ditumbuhkan dalam medium *Potato Dextrose Broth* yang dibuat dari kentang dan dekstroza untuk selanjutnya dihitung sporanya dan diencerkan sehingga didapatkan inokulum dengan kerapatan spora  $10^3$  spora/mL, buah jagung manis yang didapatkan daerah Cileungsi, Bogor, asam salisilat, asam benzoat, metanol, n-heksana, kloroform, diklorometana, eter anhidrat, aseton, asam asetat glasial, asam trifluoroasetat,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, kertas saring Whatman No. 41, NaCl, dan lain-lain. Semua bahan yang digunakan adalah *reagent grade*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (Mettler®), neraca analitik (Shimadzu®), mikroskop (Stereomaster®), *haemocytometer* (Merck®), *Laminar Air Flow* (Minihelic®), blender (Maspion®), jangka sorong, instrumen KCKT (Hitachi Inc.) yang dilengkapi detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 365 nm dan emisi 425 nm (Waters. Milipore) dan kolom  $\text{C}_{18}$  (Bondapak™), kolom *Solid Phase Extraction* silika (Varian Assoc. Inc., USA), *rotary evaporator*, *nitrogen evaporator*, dan lain-lain.

### b. Prosedur

- i. Pengaruh waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat terhadap pertumbuhan *A. Flavus*

Campuran asam benzoat dan asam salisilat (2,5 mg: 2,5 mg) dilarutkan dalam 25 mL

akuades steril lalu 75 gram buah jagung kering direndam dengan larutan campuran asam selama 30, 60, 90, dan 120 menit. Sebanyak 25 gram jagung yang telah direndam campuran asam benzoat dan asam salisilat dihancurkan dan dibuat menjadi suatu lapisan tipis di atas cawan petri. Spora *A. flavus* diambil sebanyak 1 mL dengan pipet volumetri steril dan diinokulasi pada jagung yang telah mengalami perlakuan dengan campuran asam, secara aseptis. Inokulum kemudian diinkubasi selama 10 hari pada suhu 25°C dan zona pertumbuhan inokulum diukur pada hari 2, 4, 6, 8, dan 10 menggunakan jangka sorong. Waktu perendaman dengan kecepatan pertumbuhan miselium paling kecil digunakan sebagai waktu perendaman untuk prosedur selanjutnya.

- ii. Perlakuan buah jagung dengan campuran asam benzoat dan asam salisilat pada berbagai perbandingan komposisi

Asam benzoat dan asam salisilat dengan komposisi yang berbeda-beda (0,0:5,0; 0,5:4,5; 1,0:4,0; 1,5:3,5; 2,0:3,0; 2,5:2,5; 3,0:2,0; 3,5:1,5; 4,0:1,0; 4,5:0,5; dan 5,0:0,0 mg) dilarutkan di dalam 25 mL akuades steril. Sebanyak 75 gram buah jagung kering direndam dengan larutan campuran asam sesuai selama x menit yang didapatkan dari prosedur (i). Buah jagung yang direndam dengan 25 mL akuades steril dan 5,0 mg Mancozeb yang dilarutkan dalam 25 mL akuades steril (0,0:0,0) selama x menit, juga digunakan sebagai kontrol. Sebanyak 25 gram jagung yang telah direndam campuran asam benzoat dan asam salisilat, dihancurkan dan dibuat menjadi suatu lapisan tipis di atas cawan petri. Spora *A. flavus* diambil sebanyak 1 mL dengan pipet volumetri steril dan diinokulasi pada jagung yang telah mengalami perlakuan dengan campuran asam secara aseptis. Inokulum diinkubasi selama 10 hari pada suhu 25°C, selama itu, zona pertumbuhan inokulum diukur setiap dua hari sekali dengan menggunakan jangka sorong.

- iii. Pengukuran kadar aflatoksin yang diproduksi *A. flavus* [3]

Sampel jagung yang telah diinokulasi spora *A. flavus* dan diinkubasi selama 10 hari didestruksi menggunakan autoklaf dan dikeringanginkan selama 3 hari. Sampel yang telah kering diblender dan ditimbang sebanyak 25 gram Sampel lalu diblender dengan metanol:air (85:15) dengan kecepatan tinggi selama 3 menit. Ekstrak disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman no.1 dan diambil sebanyak 20,0 mL untuk selanjutnya ditambahkan 20,0 mL larutan NaCl 10% dan 12,5 mL n-heksana. Filtrat diekstraksi selama 1 menit. Lapisan atas dibuang dan lapisan bawah diekstraksi kembali menggunakan 12,5 mL kloroform sebanyak 2 kali.

Lapisan bawah kemudian diambil dan disaring menggunakan kertas Whatman no. 41 yang telah ditambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Filtrat yang didapatkan diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu  $\pm 50^\circ\text{C}$  hingga kering. Ekstrak yang telah kering dilarutkan dengan 3,0 mL diklorometana dan dimasukkan ke dalam syringe plastik yang dilengkapi kolom SPE (*Solid Phase Extraction*) silika yang telah dibasahi dengan 3,0 mL n-heksana dan 3,0 mL diklorometana. Kolom SPE dibilas dengan 1,0 mL diklorometana, 3,0 mL n-heksana, 3,0 mL eter anhidrat, dan 3,0 mL diklorometana, kemudian dielusi dengan 10,0 mL kloroform:aseton (9:1 v/v).

Ekstrak ditampung dalam vial dan dikeringkan dalam nitrogen evaporator. Ekstrak yang telah kering diderivatisasi dengan 200  $\mu\text{L}$  n-heksana dan 50  $\mu\text{L}$  asam trifluoroasetat, didiamkan selama 15 menit, dan dikeringkan dalam nitrogen evaporator. Ekstrak yang telah kering dilarutkan dalam 5,0 mL fasa gerak metanol: asam asetat: air (15:20:65 v/v) dan disuntikkan ke instrumen KCKT yang dilengkapi detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 365 nm dan panjang gelombang emisi 425 nm dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit. Kadar aflatoksin dihitung dengan

membandingkan luas area pada waktu retensi dari masing-masing aflatoksin dibandingkan terhadap standar.

iv. Analisis Statistik

Data berupa diameter koloni (dalam mm) yang dianalisis menggunakan regresi linear untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan miselium dalam mm/hari yang merupakan *slope* dari grafik dan kadar aflatoksin (dalam ppb). Data selanjutnya dianalisis menggunakan uji F analisis variansi (ANOVA) dan uji Kruskal-Wallis.

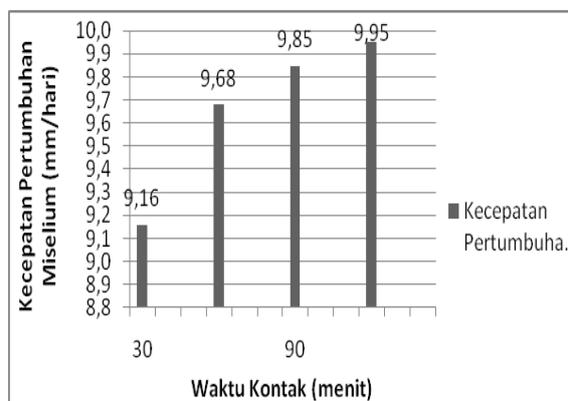
3. Hasil dan Pembahasan

a. Pengaruh Waktu Kontak Campuran Asam Benzoat dan Asam Salisilat terhadap Pertumbuhan *Aspergillus flavus*

Pengaruh waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat terhadap pertumbuhan *A. flavus* diamati dengan membuat variasi waktu perendaman buah jagung dalam campuran asam benzoat dan asam salisilat dengan komposisi yang sama yaitu pada perbandingan asam benzoat dan asam salisilat 2,5:2,5 mg/25 mL akuades dan suhu inkubasi yang konstan yaitu 25°C (Gambar 1). Variasi waktu yang digunakan yaitu selama 30, 60, 90, dan 120 menit.

Waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat mempengaruhi pertumbuhan *A. flavus*. Daya hambat terbaik ditunjukkan pada waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat selama 30 menit yang ditunjukkan dengan diameter koloni dan kecepatan pertumbuhan miselium yang lebih kecil dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat selama 30 menit menunjukkan daya hambat yang paling baik dengan kecepatan pertumbuhan miselium sebesar 9,16 mm/hari, sementara waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat selama 60, 90, dan 120 menit menunjukkan kecepatan

pertumbuhan miselium sebesar berturut-turut 9,68; 9,85; dan 9,95 mm/hari. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat, kecepatan pertumbuhan *A. flavus* menjadi semakin tinggi. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya kelembaban pada jaringan buah jagung dan adanya senyawa-senyawa tertentu pada buah jagung yang dapat menginaktivasi asam benzoat maupun asam salisilat.



Gambar 1. Pengaruh Waktu Kontak Campuran Asam Benzoat dan Asam Salisilat terhadap Pertumbuhan *Aspergillus flavus*

Waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat yang semakin lama meningkatkan kelembaban pada jaringan buah jagung. Kelembaban yang tinggi merupakan kondisi yang sesuai untuk fungi *A. flavus* tumbuh sehingga campuran asam benzoat dan asam salisilat yang diaplikasikan tidak mampu menghambat pertumbuhan *A. flavus* secara optimum. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya [9] yaitu pertumbuhan dan produksi aflatoksin *A. flavus* pada buah jagung dipengaruhi oleh kelembaban dan suhu penyimpanan buah jagung. Pada kelembaban di atas 17,5% dan suhu penyimpanan di atas 24°C, *A. flavus* tumbuh sebagai mikoflora pada buah jagung. Inaktivasi senyawa-senyawa aromatik oleh jagung diduga turut berpengaruh dalam kenaikan kecepatan pertumbuhan miselium *A. flavus* seiring dengan kenaikan waktu kontak campuran asam benzoat

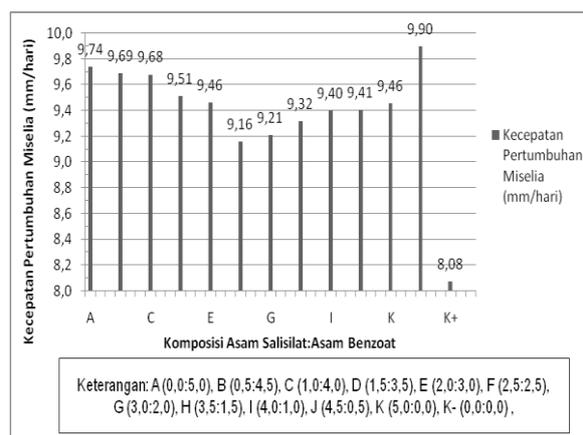
dan asam salisilat. Waktu kontak campuran asam benzoat dan asam salisilat dengan jagung yang semakin lama menyebabkan semakin tingginya inaktivasi campuran asam benzoat dan asam salisilat oleh jagung sehingga menyebabkan penurunan aktivitas asam benzoat dan asam salisilat dalam menghambat pertumbuhan *A. flavus*. Pengujian data dilakukan dengan analisis variansi (ANOVA) satu arah ( $\alpha = 0,05$ ) untuk mengetahui pengaruh waktu kontak asam terhadap kecepatan pertumbuhan *A. flavus*. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa waktu kontak asam tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kecepatan pertumbuhan *A. flavus*.

#### b. Pengaruh Komposisi Asam Benzoat dan Asam Salisilat terhadap Pertumbuhan *A. Flavus*

Pengaruh komposisi asam benzoat dan asam salisilat terhadap pertumbuhan *A. flavus* diamati dengan membuat variasi komposisi asam benzoat dan asam salisilat yang digunakan untuk merendam buah jagung, dengan waktu perendaman atau waktu kontak selama 30 menit dan suhu inkubasi 25°C (Gambar 2). Komposisi asam benzoat dan asam salisilat yang digunakan bervariasi mulai dari 0,0:5,0 hingga 5,0:0,0 dengan rentang komposisi 0,5 mg dan kontrol yaitu akuades sebagai kontrol negatif dan Mancozeb sebagai kontrol positif.

Komposisi campuran asam benzoat dan asam salisilat mempengaruhi laju pertumbuhan miselium *A. flavus*. Pertumbuhan miselium *A. flavus* menjadi semakin kecil seiring dengan perubahan komposisi campuran asam benzoat dan asam salisilat menjadi 2,5:2,5 (1:1), lalu naik kembali ketika komposisi asam benzoat dan asam salisilat menjadi 5,0:0,0. Daya hambat pertumbuhan *A. flavus* terbaik ditunjukkan oleh campuran asam benzoat dan asam salisilat dengan perbandingan 2,5:2,5 (1:1) dengan kecepatan pertumbuhan miselium 9,16 mm/hari dibandingkan dengan aplikasi asam

tunggal yaitu asam benzoat 5,0 mg/25 mL dengan kecepatan pertumbuhan miselium 9,74 mm/hari dan asam salisilat 5,0 mg/25 mL dengan kecepatan 9,46 mm/hari. Hal ini menunjukkan adanya efek aditif dari campuran kedua asam tersebut ketika diaplikasikan bersama dibandingkan dengan aplikasi tunggal dari asam-asam tersebut. Efek aditif dari asam benzoat dan asam salisilat sendiri telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya yaitu campuran asam salisilat dengan asam benzoat, asam format, asam *p*-kloro benzoat, ester metil, etil, propil, dan butil dari asam *p*-hidroksi benzoat, atau asam sorbat memiliki efek aditif dalam menghambat pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* jika dibandingkan dengan aplikasi tunggal dari senyawa-senyawa ini [8].



**Gambar 2.** Pengaruh Komposisi Asam Benzoat dan Asam Salisilat Terhadap Pertumbuhan *Aspergillus flavus*

Efek antifungal dari asam benzoat dan asam salisilat telah dilaporkan pada penelitian sebelum yang menyatakan bahwa asam salisilat (asam *o*-hidroksi benzoat) pada konsentrasi 5,0 mg/25 mL menghambat laju pertumbuhan *A. flavus* dalam medium cair hingga 50% dan produksi aflatoxin hingga 100% [6], sementara peneliti lain melaporkan bahwa asam benzoat pada konsentrasi 6,0 mg/kg medium cair mampu menghambat pertumbuhan dan produksi aflatoxin *A. flavus* secara total [7]. Aktivitas asam benzoat dan asam salisilat dalam

menghambat pertumbuhan *A. flavus* ketika diaplikasikan pada jagung seperti pada penelitian ini menurun jika dibandingkan dengan aplikasi asam benzoat dan asam salisilat pada medium cair. Hal ini diduga karena jagung sebagai media tumbuh memiliki kandungan senyawa-senyawa kimia yang mampu menginaktivasi asam benzoat dan asam salisilat sehingga aplikasi asam benzoat dan asam salisilat dengan konsentrasi yang sama tidak mampu menghambat laju pertumbuhan *A. flavus* dengan baik.

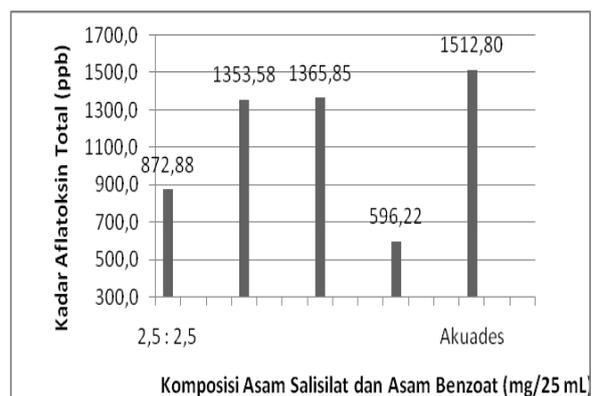
Mekanisme antifungal dari asam benzoat yang diaplikasikan pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi 2-10 mM memasuki sel fungi dalam bentuk tidak terdisosiasi sehingga pH intraseluler fungi turun hingga mencapai 1 unit [10]. Selain itu, asam benzoat juga menghambat proses metabolisme fungi dengan menghambat enzim fosfofruktokinase yaitu enzim yang berperan dalam glikolisis untuk mengubah fruktosa 6-fosfat menjadi fruktosa 1,6-difosfat sehingga fungi tidak mampu melangsungkan proses metabolisme untuk menghasilkan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan fungi. Penghambatan enzim fosfofruktokinase oleh asam benzoat disebabkan karena perubahan pH intraseluler sehingga enzim fosfofruktokinase menjadi inaktif. Asam salisilat (asam *o*-hidroksi benzoat) juga memiliki efek yang serupa yaitu menurunkan pH intraseluler dan menghambat fermentasi anaerobik glukosa hingga 95% ketika ditambahkan pada suspensi sel khamir *S. cerevisiae* dalam larutan *buffer* tartrat pH 2,5 [10].

Fungisida Mancozeb memiliki daya hambat yang lebih baik terhadap pertumbuhan fungi *A. flavus* dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini ditunjukkan dengan kecepatan pertumbuhan miselium dari *A. flavus* yaitu mencapai 8,08 mm/hari, sementara campuran asam benzoat dan asam salisilat pada komposisi 2,5:2,5 (1:1) memiliki kecepatan pertumbuhan 9,16 mm/hari dan akuades yang digunakan sebagai kontrol

negatif menunjukkan kecepatan pertumbuhan miselium 9,90 mm/hari. Hal ini menunjukkan Mancozeb sebagai kontrol positif bekerja lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *A. flavus* dibandingkan campuran asam benzoat dan asam salisilat. Analisis data dilakukan dengan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Hasil perhitungan menunjukkan nilai signifikansi data 0,413, lebih besar dari 0,05 sehingga  $H_0$  diterima. Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan *A. flavus*.

c. Pengaruh Komposisi Asam Benzoat dan Asam Salisilat terhadap Produksi Aflatoksin *A. Flavus*

Pengaruh komposisi asam benzoat dan asam salisilat pada produksi aflatoksin *A. flavus* diamati dengan memilih 3 komposisi asam benzoat dan asam salisilat dengan kecepatan pertumbuhan miselium *A. flavus* terendah setelah 10 hari masa inkubasi pada suhu 25°C (2,5:2,5; 2,0:3,0; dan 1,5:3,5) serta kontrol positif (Mancozeb) dan kontrol negatif (akuades) (Gambar 3).



**Gambar 3.** Pengaruh Komposisi Asam Benzoat dan Asam Salisilat terhadap Produksi Aflatoksin *A. flavus*

Kadar aflatoksin yang diproduksi fungi *A. flavus* pada penelitian ini berbanding lurus dengan kecepatan pertumbuhan miselium *A. flavus*. Komposisi asam benzoat dan asam salisilat mempengaruhi kadar aflatoksin yang diproduksi *A. flavus* setelah 10 hari masa

inkubasi pada 25°C dengan pengaruh terbaik ditunjukkan pada komposisi asam benzoat dan asam salisilat 2,5:2,5 mg/25 mL yang menghambat produksi aflatoxin total *A. flavus* pada 872,88 ppb, sementara campuran asam benzoat dan asam salisilat pada perbandingan 2,0:3,0 mg/25 mL dan 1,5:3,5 mg/25mL menghasilkan produksi aflatoxin total 1353,58 ppb dan 1365,85 ppb, lebih rendah dibandingkan kontrol negatif yang menghasilkan produksi aflatoxin total 1512,80 ppb. Hal ini menunjukkan adanya daya hambat campuran asam benzoat dan asam salisilat pada produksi aflatoxin *A. flavus* UICC 360 dengan daya hambat produksi aflatoxin terbaik ditunjukkan campuran asam benzoat dan asam salisilat pada komposisi 2,5:2,5 mg/25 mL (1:1) yang mampu menghambat produksi aflatoxin *A. flavus* sekitar 42,3 % jika dibandingkan dengan kadar aflatoxin total yang terdapat pada kontrol negatif. Kadar aflatoxin yang dihasilkan *A. flavus* pada semua perlakuan berbanding lurus dengan kecepatan pertumbuhan miselium *A. flavus*.

Mancozeb mampu menghambat produksi aflatoxin *A. flavus* hingga mencapai 596.22 ppb atau sekitar 60,6 % jika dibandingkan dengan kadar aflatoxin total yang dihasilkan pada kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa Mancozeb menunjukkan aktivitas yang lebih baik dalam menghambat produksi aflatoxin pada fungi *A. flavus* UICC 360. Aktivitas fungisida Mancozeb dalam menghambat produksi aflatoxin *A. flavus* pada medium MEA (*Malt Extract Agar*) [11]. Mancozeb dengan konsentrasi 10,0 µg/mL dilaporkan mampu menghambat produksi aflatoxin sebesar 85% jika dibandingkan terhadap kontrol negatif.

Asam benzoat, asam salisilat, dan Mancozeb bekerja menghambat produksi aflatoxin *A. flavus* dengan cara menghambat proses pertumbuhan *A. flavus*. Asam benzoat juga menghambat proses metabolisme fungi dengan menghambat enzim fosfofruktokinase yaitu enzim yang berperan dalam glikolisis untuk

mengubah fruktosa 6-fosfat menjadi fruktosa 1,6-difosfat sehingga fungi tidak mampu melangsungkan proses metabolisme untuk menghasilkan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan fungi [10]. Penghambatan enzim fosfofruktokinase oleh asam benzoat disebabkan karena perubahan pH intraseluler sehingga enzim fosfofruktokinase menjadi inaktif. Asam salisilat (asam *o*-hidroksi benzoat) juga memiliki efek yang serupa dengan asam benzoat dalam menghambat pertumbuhan fungi.

Daya hambat asam benzoat dan asam salisilat terhadap produksi aflatoxin *A. flavus* telah dilaporkan [6,7]. Asam salisilat dengan konsentrasi 5,0 mg/25 mL dalam medium cair mampu menghambat secara total produksi aflatoxin B<sub>1</sub> dan G<sub>1</sub> *A. flavus* NRRL 3145 pada 8 hari masa inkubasi [6]. Asam benzoat dengan konsentrasi 6,0 mg/kg medium cair mampu menghambat secara total produksi aflatoxin *A. flavus* IMI 102566 yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 6 hari [7].

Kadar aflatoxin dalam bahan makanan yang diperbolehkan FDA adalah 20 ppb [4]. Kadar aflatoxin total dalam penelitian ini berkisar dari 500-1500 ppb, sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar aflatoxin total yang diproduksi *A. flavus* setelah perlakuan masih sangat tinggi. Tingginya kadar aflatoxin dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh berbagai hal, antara lain adalah jenis *strain A. flavus* yang digunakan, adanya senyawa-senyawa kimia pada jagung yang dapat menginaktivasi asam benzoat dan asam salisilat sehingga aktivitas asam benzoat dan asam salisilat dalam menghambat pertumbuhan dan produksi *A. flavus* menurun, dan suhu inkubasi yang memicu produksi aflatoxin yang tinggi.

Data dianalisis dengan uji nonparametrik Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan uji Z. Hasil perhitungan dengan uji nonparametrik Kruskal-Wallis menunjukkan nilai signifikansi data 0,009, lebih kecil dari 0,01 sehingga H<sub>0</sub> ditolak. Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan

bahwa perlakuan memberikan perbedaan yang signifikan terhadap kadar aflatoksin total yang diproduksi *A. flavus* UICC 360 pada masa inkubasi 10 hari. Uji statistik dilanjutkan dengan uji Z untuk mengetahui kelompok manakah yang berbeda secara signifikan dalam kadar aflatoksin yang diproduksi *A. flavus* UICC 360 pada masa inkubasi 10 hari. Selisih rata-rata peringkat yang lebih besar dari nilai Z hanya terdapat pada kelompok Mancozeb dengan akuades sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kadar aflatoksin pada kelompok Mancozeb dan akuades. Ketiga variabel komposisi asam benzoat dan asam salisilat memiliki selisih rata-rata peringkat yang lebih kecil dari nilai Z yang didapatkan dari perhitungan sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan berbagai komposisi asam benzoat dan asam salisilat tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar aflatoksin *A. flavus* UICC 360 setelah 10 hari masa inkubasi.

#### 4. Kesimpulan

Campuran asam benzoat dan asam salisilat pada komposisi 2,5:2,5 mg/25 mL akuades dengan waktu kontak 30 menit menunjukkan efek penghambatan terbaik terhadap pertumbuhan dan produksi aflatoksin *A. flavus* dengan kecepatan pertumbuhan 9,16 mm/hari dan kadar aflatoksin 872,88 ppb, sementara kontrol positif Mancozeb 5,0 mg/25 mL akuades menunjukkan daya hambat yang lebih baik dengan kecepatan pertumbuhan 8,08 mm/hari dan kadar aflatoksin 596,22 ppb. Perlu dilakukan penelitian mengenai alternatif teknik aplikasi campuran asam benzoat dan asam salisilat yang lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan dan produksi aflatoksin *A. flavus*, misalnya dengan penyemprotan.

#### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditunjukkan kepada PT. Indofood Sukses Makmur Tbk. yang telah membiayai penelitian ini lewat program Indofood Riset Nugraha.

#### Daftar Pustaka

- [1] Bankhole S. A., Mebekoje, O. O. 2004. Occurrence of Aflatoxins and Fumonisin in Preharvest Maize from Southwestern Nigeria. *Food Addit. Contam.* **21**, 251-255.
- [2] Lee, A. N. 2004. Mycotoxins and Their Analysis. Training Course on Prevention and Control of Mycotoxin in Food and Feedstuff SEAMEO BIOTROP. Bogor, Indonesia, 21–26 Juni 2004.
- [3] Widiastuti, R., Indraningsih, Firmansyah, R. 2008. Analisis Aflatoksin pada Jagung yang Dimurnikan dengan Solid Phase Extraction Silika dan Dideteksi dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2008.
- [4] Larson, E. 2009. *Minimizing Aflatoxin in Corn*. <http://msucare.com/pubs/infosheets/is1563.htm>. [24 Juli 2011].
- [5] Samapundo, S., Meulenaer, B. D., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007. Can Phenolic Compounds be Used for the Protection of Corn from Fungal Invasion and Mycotoxin Contamination During Storage?. *Food Microbiology*. volume **24**, issue 5, p. 465-473.
- [6] Chipley, J. R. dan Uraih, N. 1980. Inhibition of *Aspergillus* Growth and Aflatoxin Release by Derivatives of Benzoic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 352-357.

- [7] Thanaboripat, D., Premisri, T., Punbusayakul, N., Sukcharoen, O. 1996. Effect of Food Preservatives on Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* In Liquid Medium. Thailand: King Mongkhut Institute of Technology.
- [8] Osman, H. G., El-Mariah, A. 1960. Studies on the Inhibitory Effect of Combined Chemical Preservatives on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. **49**: 231–233.
- [9] Trenk, H. L., Hartman, P. A. 1970. Effect of Moisture Content and Temperature on Aflatoxin Production In Corn. *Applied Microbiology* p. 781-784.
- [10] Chourasia, H. K. 1992. Control of Aflatoxin Production With Fungicides. *Nat. Acad. Sci. Letters*. **15**(8): 243-246.
- [11] Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M. 1983 Studies on the Mechanism of the Antifungal Actions of the Benzoate. *Biochem J*. **214**. 657-663.