Stigma Volume VIII No.3, Juli-September 2000

PEMANFAATAN EKSTRAK DAUN ALPOKAT (*Persea gratissima* Gaertn.) UNTUK MENEKAN PERTUMBUHAN BAKTERI *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* SECARA *IN VITRO*

(The used of alvocado leafs extract (*Persea gratissima* Gaert) to suppresed the growth of bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* with in vitro)

Moralita Chatri, Yulmizar Hasan dan Des. M [*)]

ABSTRACT

The study of alvocado leafs extract (*Persea gratissima* Gaertn.) to suppresed the growth of bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (*Psg*) *in vitro* was carried out from September to December 1999, at Biology Laboratory, Faculty of Mathematics and Natural Science, University of Padang. This experiment used Completely Randomized Design (CRD) with six treatments, as follow: without alvocado leafs extract as control and various concentration alvocado leafs extract (30%, 40%, 50%, 60% and 70%). The result indicated that paper with 30% of alvocado leaf extract did not forming barrier zone.That mean this concentration could not suppresed the growth of *Psg*. The application 40% and 50% shown barrier zone, but didn't exactly different with control. The application 60% and 70% shown barrier zone (1,375 mm) and exactly different with control.

PENDAHULUAN

Penyakit hawar bakteri (*bacterial blight*) pada kedelai adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (*Psg*). Bakteri ini tergolong sangat merugikan karena dapat menginfeksi mulai dari benih sampai tanaman di lapangan (Habazar, 1989). Bakteri ini juga dapat bertahan dalam benih selama dua tahun dan gejalanya sering tidak terlihat bila berada pada embrio atau bagian lainnya dalam biji (Sinclair dan Schurtleff, 1980). Serangan pada daun muda menyebabkan daun tersebut menjadi kerdil, sedangkan pada bibit terutama pada titik tumbuh menyebabkan tanaman mati (Habazar, 1989). Serangan bakteri yang parah, gejalanya dapat ditemui pada batang, tangkai daun dan polong (Mahmud, 1989).

Faktor virulensi yang berperan dalam proses infeksi bakteri ini terutama ditentukan oleh toksin Coronatin penyebab kematian jaringan (Rudolph, 1976) dan Ekstraseluler Polisakarida (EPS) penyebab gejala kebasahan (Osman, *et al*. 1986).

Cara pengendalian yang dilakukan dengan penggunaan senyawa kimia terhadap patogen ini belum memadai. Di samping itu penggunaan senyawa kimia seringkali menimbulkan permasalahan antara lain adanya efek residu pestisida yang tertinggal di dalam tanaman dan timbulnya pencemaran terhadap lingkungan. Alternatif pengendalian penyakit guna membatasi penggunaan pestisida kimiawi dikenal dengan sistem Pengendalian Hama Terpadu (PHT), yang tertuang dalam Undang-undang No. 12 tahun 1992, tentang sistem Budidaya Tanaman pasal 20. Dalam PHT, pemakaian pestisida kimiawi diharapkan seminimal mungkin, sedangkan cara lain lebih banyak diterapkan dan dimanfaatkan.

Salah satu cara untuk menghindari pemakaian pestisida ini adalah dengan pemanfaatan bahan alami, khususnya yang berasal dari tumbuhan. Wigenasantana (1993) menyatakan bahwa terjadinya hubungan timbal balik yang berlangsung lama pada tumbuhan dengan organisme pengganggu, menyebabkan tumbuhan mengasilkan senyawa kimia yang bersifat toksik, sebagai pemikat, penolak atau penghambat perkembangan organisme pengganggu tersebut. Senyawa aktif yang diperoleh dari tumbuhan, selain daya racunnya tinggi, juga mudah mengalami biodegradasi yang diperkirakan tidak akan berbahaya bagi lingkungan.

Hutan tropis merupakan sumber hayati yang kaya dengan berbagai spesies tumbuhan. Sebagian dari tumbuhan tersebut telah diklasifikasikan dalam 185 famili. Tumbuhan tropis selain dimanfaatkan sebagai sumber bahan bangunan, juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan dan pestisida alami. Berbagai jenis tumbuhan menghasilkan metabolit sekunder yang fungsinya antara lain untuk mempertahankan dirinya terhadap organisme pengganggu. Dari hasil penelitian Hanudin dan Djatnika (1986), ekstrak dari bawang putih yang mengandung senyawa alhin, ternyata mampu menekan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith, yang menyebabkan penyakit layu pada kentang. Hartati, dkk. (1994) juga melaporkan bahwa serbuk daun cengkeh yang mengandung eugenol

*) Fakultas MIPA Universitas Negeri Padang

dapat menekan pertumbuhan bakteri *P. solanacearum*.

Penelitian tentang pengaruh ekstrak daun alpokat terhadap patogen penyebab penyakit pada tumbuhan belum ada dilaporkan. Tetapi dari hasil penelitian, daun tanaman ini mempunyai aktivitas anti bakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Menurut Ognulans dan Ramstand (1975) *cit.* Wijayakusuma, dkk. (1996), daun alpokat dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus strain A dan B, Staphylococcus albus, Pseudomonas sp., Proteus sp., Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

Dari analisis kimiawi, daun tanaman ini mengandung beberapa senyawa kimia, antara lain flavonoid yang merupakan senyawa fenolik dan alkaloid yang sering bersifat toksik. Metraux dan Raskin (1993) menjelaskan bahwa senyawa fenolik merupakan salah satu faktor ketahanan kimia tanaman terhadap patogen.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian dengan tujuan melihat pengaruh ekstrak daun alpokat terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang, yang berlangsung dari bulan September sampai Desember 1999.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan adalah sebagai berikut : A. Kontrol (tanpa ekstrak daun alpokat), B. konsentrasi ekstrak daun alpokat 30%, C. konsentrasi ekstrak daun alpokat 40%, D. konsentrasi ekstrak daun alpokat 50%, E. konsentrasi ekstrak daun alpokat 60%, dan F. konsentrasi ekstrak daun alpokat 70%.

Untuk mengisolasi bakteri dilakukan seperti berikut : Jaringan daun dari tanaman kedelai yang bergejala bercak nekrotik bersegi dikelilingi halo berwarna kuning/klorosis dipotong ukuran 0,5 cm2, disterilisasi permukaannya dengan ethanol 70% selama 1 menit, dibilas dengan air steril dan ditumbuk dalam lumpang porselen steril. Selanjutnya ditambahkan 3 ml larutan 0,1 M $MgSO_4$ 7 H_2O ke dalam lumpang tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung perbenihan, kemudian dibilas lagi dengan 2 ml 0,1 M $MgSO_4$ $7H_2O$. Dari suspensi ini dibuat seri pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-4} dan dihomogenkan. Seri pengenceran 10^{-4}, 10^{-5}, dan 10^{-6} masing-masing dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam tabung perbenihan yang berisi medium King's B yang masih cair (suhu 46° C), dihomogenkan dan dituangkan ke dalam cawan petri. Biakan ini diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 26° - 28° C.

Koloni tunggal yang tumbuh dengan ciri khas *Psg*. yaitu menghasilkan pigmen fluorescen dimurnikan dalam medium King's B secara gores dan diinkubasi selama 2 x 24 jam. Isolat tersebut dipindahkan ke dalam medium miring YDC, diinkubasi 2 x 24 jam dan disimpan dalam refrigerator (Klement, *et al*. 1990).

Isolat dipindahkan secara gores pada medium King's B dan diikubasi selama 2 x 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati warna, bentuk keseluruhan, permukaan, pinggiran dan ukurannya.

Isolat dibiakkan dalam medium King's B dan diinkubasi 2 x 24 jam. Satu tetes KOH 3% diletakkan di atas gelas objek. Kemudian diambil biakan bakteri dengan jarum ose dan dicampurkan dengan larutan tersebut. Kalau terjadi penggumpalan maka bakteri tersebut bersifat Gram negatif.

Bakteri dipindahkan ke dalam medium nutrien agar yang ditambah sukrosa 5% (w/v) dengan metode gores dan diikubasi selama 3 - 5 hari. Produksi levan ditandai dengan terbentuknya koloni mukoid berwarna putih dan berbentuk konveks.

Bakteri dipindahkan dengan metoda gores ke medium Nutrien Agar yang ditambah glukosa 1% dan diinkubasi selama 24 jam. Kertas saring dibasahi dengan larutan encer tetramethyl-phenylene-diamine dihydrochloride 1%, kemudian koloni bakteri diambil dengan tusuk gigi dan dioleskan pada kertas saring tersebut. Hasil pengujian dinyatakan sebagai :

- "Oksidase positif" apabila warna berubah menjadi ungu (*purple*) dalam waktu 10 detik
- "Delayet - positif" apabila warna berubah menjadi ungu dalam waktu 10 - 60 detik
- "Negatif" apabila setelah 60 detik tidak terjadi perubahan warna

Potongan umbi kentang sebesar 1 cm^3 disterilisasi permukaan dengan ethanol 70% dan dibilas dengan aquadest steril, kemudian potongan tersebut diletakkan pada cawan petri yang telah dilapisi kertas saring lembab dan diinokulasikan dengan 1 ml suspensi bakteri yang murni dibagian tengahnya, kemudian diinkubasi selama 5 hari. Bila terjadi pembusukan dan perubahan warna menjadi coklat dan akhirnya hitam, berarti isolat tersebut menghasilkan pektinase.

Biakan bakteri yang berumur 48 jam pada medium King's B, disuspensikan dengan 10 ml aquades steril sehingga terlihat keruh. Suspensi bakteri ini diinfiltrasi secara interselluler pada bagian bawah daun tembakau yang berumur 6 minggu. Selanjutnya tanaman diinkubasi. Reaksi dinyatakan positif bila bagian yang diuji menunjukkan gejala kolaps dalam waktu 24 jam setelah infiltrasi.

Kapas diceluplkan ke suspensi bakteri dan dioleskan pada daun kedelai yang telah dilukai pada bagian bawahnya. Biarkan selama 1 - 2

menit. Kemudian tanaman ter-sebut diinkubasi pada suhu kamar dan kelembaban > 90 % (diberi goni basah di lantai).

Perkembangan gejala diamati tiap hari sampai hari ke 21 setelah inokulasi. Ciri khas gejala yang diamati adalah *water soaking*, bercak bersudut dan adanya halo yang berwarna kuning.

Pembuatan ekstrak daun alpokat dengan cara menimbang 50 gram daun alpokat kemudian dicampurkan dengan aquades steril sebanyak 200 ml, kemudian diblender dan disaring sehingga terbentuk ekstrak. Hasil ekstraksi disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan alat pembeku (refrigerator)

Untuk pengujian ini digunakan metoda kertas cakram. Terlebih dahulu dipindahkan 1 ml suspensi *Psg* (10^8 CFU/ml) ke dalam agar NA dalam cawan petri. Kertas cakram yang telah disterilkan (diameter 1 cm) dicelupkan ke dalam ekstrak daun alpokat sesuai dengan perlakuan. Kemudian diletakan pada permukaan biakan bakteri di atas. Biakan lalu diinkubasi (Klement, *et al.* 1990).

Ada tidaknya pengaruh ekstrak daun alpokat dalam menghambat pertumbuhan bakteri dilakukan pengukuran terhadap daerah hambatan yang muncul di sekitar kertas cakram. Pengamatan dilakukan setelah koloni bakteri diinkubasi 2 x 24 jam. Data dianalisis ragam dengan uji DNMRT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil seperti pada Tabel 1. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa perlakuan dengan konsentrasi 30% (B) tidak menunjukkan adanya daerah hambatan sama sekali. Perlakuan dengan konsentrasi yang lebih tinggi (40%) sudah mulai memperlihatkan adanya daerah hambatan, begitu juga dengan perlakuan konsentrasi 50%. Tetapi ketiga perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kontrol. Tidak adanya perbedaan yang nyata antara ketiga perlakuan dengan kontrol diperkirakan karena senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun alpokat tidak mencukupi untuk menekan pertumbuhan bakteri *Psg*, sehingga daerah hambatan yang terbentuk kecil, bahkan pada perlakuan konsentrasi 30% tidak menimbulkan daerah hambatan sama sekali. Berarti perlakuan dengan konsentrasi ini tidak dapat menekan pertumbuhan bakteri *Psg*.

Daerah hambatan terbesar adalah pada perlakuan konsentrasi 60% (E) dan konsentrasi 70% (F) dan menunjukkan perbedaan yang nyata dengan perlakuan konsentrasi 40% (C), 30% (B) dan kontrol (A). Besarnya daerah hambatan pada kedua perlakuan ini menunjukkan angka yang sama, yaitu 1,375 mm. Berarti peningkatan konsentrasi dari 60% ke 70% tidak lagi menunjukkan peningkatan besarnya daerah hambatan. Berarti juga tidak menambah hambatan terhadap pertumbuhan bakteri.

Tabel 1. Pengaruh ekstrak daun alpokat (*Persea gratissima* Gaertn.) terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycine* dengan terbentuknya daerah hambatan

Perlakuan	Rata-rata diameter daerah hambatan (mm)
0 % (A)	0,0 a
30% (B)	0,0 a
40% (C)	0,25 a
50% (D)	0,75 ab
60% (E)	1,375 b
70% (F)	1,375 b

Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada lajur tidak berbeda nyata dengan uji lanjutan Duncan (DNMRT) pada taraf nyata 5 %

Besarnya daerah hambatan yang timbul pada perlakuan konsentrasi 60% dan 70%, diperkirakan karena tingginya konsentrasi senyawa-senyawa yang terkandung pada ekstrak daun alpokat, misalnya plavonoid. Plavonoid merupakan senyawa yang kerangka karbonnya terdiri atas 2 gugus C_6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (C_6-C_3-C_6). Senyawa ini umumnya terdapat pada tumbuhan tinggi, baik dalam bagian vegetatif maupun dalam bunga. Menurut Robinson (1990), selain berfungsi bagi tumbuhan sebagai pengaturan tumbuh dan pengaturan fotosintesis, plavonoid juga dapat bekerja sebagai antimikroba dan antivirus. Seperti yang telah diketahui, plavonoid merupakan senyawa fenolik. Doerge (1992) menjelaskan bahwa koefisien fenol dapat didefinisikan sebagai perbandingan pengenceran desinfektan terhadap pengenceran fenol yang diperlukan untuk membunuh galur mikroorganisme tertentu. Lebih lanjut dijelaskan, bahwa dinding sel bakteri gram negatif lebih mungkin dapat menjelaskan aktifitas anti bakteri yng lebih besar. Dinding sel bakteri gram negatif isinya lebih lipid daripada sifat kopeptid dinding sel bakteri gram positif. Beberapa fenol lebih melarutkan lemak terhadap bakteri gram negatif dibandingkan dengan bakteri gram positif. Dengan demikian bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycine* yang merupakan bakteri gram negatif, berkemungkinan mengalami kerusakan pada dinding selnya, karena aktifitas antimikroba fenol dapat menyebabkan kerusakan struktural dan pengubahan mekanisme permiabilitas mikrosom, lisosom dan dinding sel bakteri.

Selain plavonoid, zat yang terkandung dalam daun alpokat adalah alkaloid. Dari penelitian yang telah dilakukan, menurut Doerge (1992), telah dapat diisolasi senyawa alkaloid dari tanaman *Vinca rosea* Linneus dan disebut alkaloid vinka. Alkaloid ini telah digunakan sebagai zat anti tumor, karena dapat menyebabkan

terhentinya pembelahan mitosis. Dengan demikian, alkaloid yang terkandung dalam daun alpokat diduga juga dapat menghambat terjadinya pembelahan mitosis pada bakteri.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Konsentrasi yang tinggi dari ekstrak daun alpokat (50%, 60% dan 70%) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycine* dan menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kontrol.
2. Konsentrasi yang rendah dari ekstrak daun alpokat (30%) tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycine*.

Saran

Disarankan kepada peneliti lainnya untuk dapat melanjutkan penelitian ini secara langsung ke tanaman kedelai yang terserang bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycine* dengan mempergunakan ekstrak daun alpokat sesuai dengan konsetrasi yang telah didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

Alivizatos, A.S and S.Puntaris. 1992. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in Soybean Seed Lots Intended for Import to Greece in 1990. Plant Pathogenic Bacteria Versailles (France). 1027:391-396.

Doerge, R.F. 1990. Buku Teks Wilson dan Gisvold Kimia farmasi dan medisinal organik. Edisi VIII. JB. Lippincott Company. Philadelphia-Toronto.

Habazar, T. 1989. Inventarisasi Penyakit-penyakit Bakteri pada Tanaman Kedelai. Pusat Penelitian Universitas Andalas. Padang.

Hamdin dan Djamika. 1986. Pengaruh Ekstrak Beberapa Tanaman Terhadap Pertumbuhan Bakteri Layu (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) Secara In Vitro. Bull. Penel. Hort. Vol. XIV. No. 1.

Hartati, S.Y., M.Esther, Adhi, A. Arifal dan K. Nuri. 1994. Efikasi Eugenol, Minyak dan Serbuk cengkeh terhadap Bakteri *Pseudomonas solanacearum*. Prosiding Hasil Penelitian dalam Rangka Pemanfaatan Pestisida Nabati. Bogor 1-2 Desember.

Klement, Z, K. Rudolph and D.C Sands. 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademia Kiado, Budapest.

Lim, S.M. 1992. Bacterial Blight on Soybean in Plant of International Importance. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey.

Mahmud, M. 1989. Pengamatan Penyakit Pustul dan Hawar Bakteri Kedelai. Makalah disampaikan pada Kongres dan Seminar Ilmiah ke X di Bali.

Metraux J.P. and I. Raskin. 1993. Role of Phenolic in Plant Disease Resistance in Biotechnology in Plant Disease Control. Edited by Ilan Chet. A John Wiley & Sons, Inc Publication. New York.

Misaglo, I.J. 1982. Physiology and Biochemistry of Plant-Pathogen Interactions. Plenum Press. New York and London.

Mitchell, R.E and H.Young. 1978. Identification of a Chlorosis - Inducing Toxin of *Pseudomonas glycinea* as Coronatin Phytochemistry. 17:2028-2029.

Osman, S.F., W.F. Fett and M.L. Fishman. 1986. Exopolysaccharides of The Phytopathogen *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 166:66-71.

Robinson, T. 1992. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Edisi ke enam. Penerbit ITB. Bandung.

Rudolph, K. 1976. Non Host Spesifik Toxins in Encyclopedia of Plant Pathology by R. Heitefuss and P.H Williams (eds). Spanger-verlag New York. pp 270-315.

.....1995. *Pseudomonas syringae* pathovars in Pathogenesis an d Host specificity in Plant Disease by Singh, U.S., R.P Singh and K. Kohmoto. Elsevier Science Ltd. Japan. pp 47-138.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Pathogenic Bacteria-Bacteriology Committee of American Phytopathological Society St. Paul. Minn. 72 p.

Semangun, H. 1993. Penyakit-penyakit Tanaman Pangan di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 449 hal.

Sinclair, J.B and N.C Schuelteff. 1980. Compedium of Soybean Disease. APS. Minnesota USA.

.....1982. Compedium of Soybean Disease. Second Edition. The International Soybean Program (INTSOY). College of Agriculture. University of Illinoist at Urbana-Champaign.

Van Steenis, C.G.G.J. 1981. Flora untuk Sekolah di Indonesia. PT Pradya Paramita. Jakarta Pusat.

Wijayakusuma, H., S. Dalimartha dan A.S. Wirian. 1996. Tanaman Berkasiat Obat di Indonesia. Pustaka Kartini. Jakarta.

Wigenasantana, M.S. 1993. Sambutan Direktur Bina Perlindungan Tanaman. Makalah pada Seminar Pemanfaatan Bahan Alami dalam Upaya Pengendalian Populasi Organisme Pengganggu Tumbuhan Cisarua. 10-11 Agustus 1993.