

Efektivitas Ekstrak Tumbuhan untuk Mengeliminasi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada Benih Tomat

Effectiveness of Plant Extracts to Eliminate Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on Tomato Seeds

Aprizal Zainal^{1*}, Aswaldi Anwar¹, Satriyas Ilyas², Sudarsono², dan Giyanto³

¹Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas Padang, Kampus Limau Manis Padang, Sumatera Barat, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga 16680, Indonesia

³Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Kamper, Kampus IPB Darmaga 16680, Indonesia

Diterima 9 Desember 2009/Disetujui 26 Maret 2010

ABSTRACT

Objectives of experiments were to evaluate (1) in vitro inhibitory effects of plant extracts on Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm), (2) inhibitory effects of plant extracts on Cmm infected tomato seeds, and (3) effectiveness of seed treatment plus plant extracts to eliminate Cmm. After evaluating 20 plant extracts, curcuma rhizome and betel vine leaf extract, cinnamon and clove oil were selected for further test. Tomato seeds were artificially inoculated with Cmm to obtain high level of infection. Part of the seeds were dipped in either suspension of selected extracts for 20 minutes and the others were matriconditioned using a mixture of burned rice hull (at 22 °C and RH 60-70%) plus either of plant extracts oils, respectively. Elimination of Cmm level from infected seeds was observed at 10 days after treatments. Results of the experiment indicated curcuma extract, betel vine extract, cinnamon oil or clove oil showed in vitro inhibitory effects on Cmm. Moreover, dipping infected seeds in either 5% of curcuma, betel vine extract, or 0.5% of clove oil or matriconditioning plus these extracts oils were effective to eliminate Cmm from infected seeds. These treatments may potentially be used and developed commercially for eliminating seedborne Cmm on infected tomato seeds.

Keywords: Bacterial cancer, seedborne-pathogen, seed-treatments

PENDAHULUAN

Proses pengadaan benih sayuran di Indonesia, langkah-langkah manajemen mutu seharusnya melibatkan Badan Karantina Pertanian, Balai Pengawasan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura, dan produsen benih (Anwar *et al.*, 2005).

Bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Cmm) adalah agens penyakit kanker bakteri yang ditransmisikan melalui benih (*seed-transmitted pathogen*) dan dapat menyebabkan kerugian serius pada pertanaman tomat (Basim *et al.*, 2004). Evaluasi terhadap lot benih tomat komersial yang beredar sepanjang tahun 2000-2003 di Indonesia oleh Anwar *et al.* (2004a,b) menunjukkan bahwa beberapa lot benih telah tercemar Cmm, karena itu keberadaannya di antara benih tomat komersial di Indonesia perlu mendapat perhatian serius.

Belakangan ini pendekatan pengendalian penyakit mulai bergeser meninggalkan fungisida yang berpotensi menimbulkan masalah kesehatan. Fungisida berbasis

merkuri dan lindane telah secara menyeluruh dilarang digunakan di Eropa (Brandl, 2001). Ekstrak tumbuhan seperti minyak atsiri sebagai pestisida untuk pengendalian penyakit semakin mendapat perhatian (Paul and Sharma, 2002; Park *et al.*, 2003; Bowers *et al.*, 2004; Pino *et al.*, 2004;). Minyak dan tepung daun cengkeh, minyak sereh wangi, ekstrak mimba dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *Colletotrichum capsici* secara *in vitro* (Sutariati *et al.*, 2005; Asie, 2004; Biswas *et al.*, 2002). Kandungan 2',6'-*dihydroxy-4'methoxychalcone* pada sirih hutan menghambat 98% parasit *Leishmania amazonensis* secara *in vitro* (Santos *et al.*, 1999; Rali *et al.*, 2007). Temulawak dengan bahan aktif *xanthorizol* memiliki aktivitas fungisida terhadap sejumlah *Candida sp.* (Rukayadi *et al.*, 2006). Kulit kayu manis mengandung *cinnamaldehyde* sebagai anti fungi (*Saccharomyces cerevisiae*), antimikroba gram positif (*Staphylococcus albus*) dan gram negatif (*Eschericia coli*) (Maidment *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2002).

Anwar *et al.* (2004a) telah mencoba mengeliminasi Cmm dari lot benih tomat hingga > 99% terbebas dari infeksi Cmm dengan 0.5% minyak cengkeh tanpa menurunkan kualitas benih. Agar lebih efektif, perlakuan *matriconditioning* plus ekstrak tumbuhan dapat dilakukan mengingat uap ekstrak

* Penulis untuk korespondensi. e-mail : ap_zainal@yahoo.com

tumbuhan diharapkan dapat menjangkau lokasi *Cmm* di bagian dalam benih yang terinfeksi. *Matriconditioning*, *coating*, atau *pelleting* telah digunakan untuk meningkatkan perkecambahannya atau melindungi benih dari infeksi patogen (Ilyas, 2006). *Matriconditioning* memakai media karbon aktif dengan nisbah 1 : 2 : 1 pada suhu 22 °C selama 3 hari, dengan penambahan minyak cengkeh dilaporkan efektif mengeliminasi *seedborne Colletotrichum capsici* dari benih cabai (Ilyas *et al.*, 2002). Selain karbon aktif, media yang dapat digunakan untuk *matriconditioning* adalah abu gosok, serbuk gergaji dan arang sekam (Yunitasari dan Ilyas, 1994). Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan suatu formulasi perlakuan benih untuk menurunkan kemungkinan penyebaran *Cmm* melalui benih tomat.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang dari bulan Juli sampai dengan November 2008.

Minyak dan Ekstrak Tumbuhan sebagai Bakterisida Nabati

Jenis minyak dan ekstrak tumbuhan yang digunakan adalah minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*), sereh wangi (*Cymbopogon nardus*), kulit kayu manis (*Cinnamomum burmannii*); ekstrak daun kunyit (*Curcuma longa*), kencur (*Kaempferia galanga*), mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), surian (*Toona sureni*), beringin sungsang (*Ficus deltoidea*), pluche (*Pluche indica*), sirih hutan (*Piper aduncum*), gambir (*Uncaria gambier*), rutin (*Manihot utilissima*), bunga pahit (*Thitonia diversifolia*), sirih (*Piper betel*), dan daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*); ekstrak biji pala (*Myristica fragrans*), ekstrak rizoma temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), ekstrak umbi bawang putih (*Allium sativum*), serta ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Pemberian antibiotik kloramfenikol sebagai pembanding.

Benih Tomat Terinfeksi Buatan

Bahan yang digunakan benih tomat cv. Marta nomor lot 6107516024. Benih tomat terinfeksi *Cmm* secara alami tidak tersedia, maka lot benih tomat terinfeksi berat oleh *Cmm* didapatkan dengan perlakuan inokulasi buatan (*artificial inoculation*), yaitu dengan merendam benih tomat di dalam suspensi isolat *Cmm* SLK-11 yang berasal dari Danau Kembar, Solok (Zainal *et al.*, 2008) dengan konsentrasi 3×10^8 cfu mL⁻¹ dan dikocok di atas *shaker* dengan kecepatan 300 rpm selama 30 menit. Benih yang telah diinokulasi dikeringkan dengan tiupan udara hangat, berasal dari pengering rambut (*hair dryer*) yang diatur pada suhu sekitar 36 °C, selama 45 menit kecepatan angin 40 km jam⁻¹. Jarak antara pengering rambut dengan benih diatur sekitar 20 cm. Pengeringan benih dilakukan sehingga kadar air benih setelah perlakuan mendekati kadar air benih awal sebelum perlakuan. Benih disimpan dalam wadah plastik kedap udara selama satu minggu sebelum digunakan dalam percobaan berikutnya.

Penentuan Lokasi Patogen Cmm pada Benih Hasil Inokulasi Buatan

Keberadaan *Cmm* pada benih ditentukan secara *agar dilution plating* menggunakan ekstrak benih sebagai data tingkat kontaminasi awal, air bilasan setelah sterilisasi sebagai data tingkat kontaminasi yang ada di permukaan benih, dan pada ekstrak benih setelah sterilisasi sebagai data tingkat infeksi dalam jaringan internal benih.

Skrining Daya Hambat Jenis Ekstrak Tumbuhan terhadap Cmm secara In Vitro

Skrining anti mikroba 20 jenis ekstrak tumbuhan terhadap enam isolat *Cmm* : SLK-11 (asal Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat), AGM-7 (Agam-Sumatera Barat), CJR-45 (Cianjur-Jawa Barat), R JL-74 (Rejang Lebong-Bengkulu), MLG-65 (Malang-Jawa Timur), dan KDR-68 (Kediri-Jawa Timur) (Zainal *et al.*, 2008) dilakukan melalui skrining awal. Ekstrak tumbuhan yang menunjukkan daya hambat terhadap *Cmm* dalam uji *in vitro* dipilih untuk diterapkan dalam pengujian menggunakan benih terinfeksi. Penentuan konsentrasi ekstrak yang efektif sebagai anti mikroba dilakukan melalui uji konsentrasi hambat minimal. Uji skrining awal dan penentuan konsentrasi tersebut dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode difusi agar (Schaad *et al.*, 2001) memakai kertas *Whatman* No 3 berdiameter 0.5 cm.

Metode difusi agar dilakukan sebagai berikut: stok ekstrak tumbuhan (1%) dibuat dengan melarutkan ekstrak 1 mL dalam DMSO 2.5 mL dan disuspensikan dalam air. Stok ekstrak tumbuhan dipipet sebanyak 10 µL dan diteteskan pada kertas *Whatman* No 3 berdiameter 0.5 cm. Kloramfenikol (3 µg µL⁻¹) sebanyak 10 µL diteteskan pada kertas *Whatman* sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatif larutan DMSO (2.5%) 10 µL tanpa ekstrak tumbuhan. Medium NA bersuhu 45 °C ditambahkan 100 µL suspensi isolat *Cmm* (OD 0.25 pada λ 580 nm) disuspensikan dengan putaran teratur sehingga merata, kemudian campuran tersebut dituangkan ke cawan petri (diameter 9 cm) dan dibiarkan menjadi padat. Kertas *Whatman* yang sudah diberi ekstrak tumbuhan, kontrol positif, kontrol negatif diletakkan pada permukaan campuran bakteri dan medium dan diinkubasi 24-48 jam dalam ruang inkubasi bersuhu 26-28 °C, diamati dan diukur dengan jangka sorong terbentuknya halo (transparan) di sekitar kertas *Whatman*.

Uji Daya Hambat Minyak dan Ekstrak Tumbuhan terhadap Cmm pada Benih Terinfeksi

Minyak kulit kayu manis, ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh efektif secara *in vitro* diuji daya hambatnya terhadap *Cmm* pada benih terinfeksi. Uji tiap ekstrak tersebut menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan unit percobaan satu cawan petri, masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Benih terinfeksi (6 g) direndam selama 20 menit dalam tiap ekstrak tersebut.

Setelah perendaman dalam ekstrak tersebut, benih dibilas satu kali dengan akuades steril dan diekstraksi menggunakan buffer PBT. Cairan ekstraksi benih diencerkan hingga 100 kali. Ekstrak benih yang telah diencerkan (0.5 mL) ditumbuhkan dalam media SCM dalam ruang bersuhu 26-28 °C. Jumlah koloni *Cmm* dan bakteri saprofit lainnya yang tumbuh dalam media SCM dihitung pada 10 hari setelah *plating*.

Penentuan Efektivitas Eliminasi Cmm dari Lot Benih Tomat Terinfeksi

Eliminasi *Cmm* dari lot benih tomat terinfeksi dievaluasi menggunakan minyak dan ekstrak tumbuhan dan konsentrasi yang menghambat *Cmm* berdasarkan penelitian sebelumnya. Percobaan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 perlakuan, tiap perlakuan diulang tiga kali sehingga terdapat 30 satuan percobaan.

Setiap perlakuan disiapkan tiga kantong benih tomat masing-masing (8 g) terinfeksi *Cmm*. Perlakuan benih terdiri atas (1) perendaman dalam minyak kulit kayu manis 5% selama 20 menit, (2) *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5%, (3) perendaman dalam minyak cengkeh 0.5% selama 20 menit, (4) *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0.5%, (5) perendaman dalam ekstrak daun sirih hutan 5% selama 20 menit, (6) *matriconditioning* plus ekstrak daun sirih hutan 5%, (7) perendaman dalam ekstrak rizoma temulawak 5% selama 20 menit, (8) *matriconditioning* plus ekstrak rizoma temulawak 5%, (9) *matriconditioning* tanpa ekstrak tumbuhan, dan (10) benih terinfeksi *Cmm* tanpa perlakuan benih untuk pembandingan. *Matriconditioning* dilakukan pada suhu 22 °C dan RH 60-70% di bawah cahaya lampu selama 4 hari. Setelah perlakuan, benih tomat

dibilas satu kali dengan akuades steril dan dikeringkan kembali dengan pengering rambut sebagaimana dijelaskan sebelumnya.

Benih terinfeksi yang telah diberi perlakuan diekstraksi menggunakan buffer PBT dan cairan hasil ekstraksi benih diencerkan hingga 100 kali. Ekstrak benih yang telah diencerkan (0.5 mL) ditumbuhkan dalam media SCM dalam ruang bersuhu 26-28 °C. Jumlah koloni *Cmm* dan bakteri saprofit lainnya yang tumbuh dalam media SCM dihitung pada 10 hari setelah *plating*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Penentuan Lokasi Patogen Cmm pada Benih Hasil Inokulasi Buatan

Benih hasil inokulasi buatan terinfeksi *Cmm* dengan konsentrasi 368.3×10^2 cfu mL⁻¹. Setelah sterilisasi dan beberapa tahapan pembilasan, air bilasan terakhir yang ditumbuhkan pada medium SCM tidak mengandung bakteri *Cmm* (Tabel 1), yang mengindikasikan bahwa *Cmm* yang ada di permukaan benih telah tereliminasi dengan sterilisasi. *Plating* ekstrak benih tomat hasil inokulasi buatan setelah tahapan sterilisasi dan pembilasan menghasilkan koloni bakteri 0.7×10^2 cfu mL⁻¹. Hal ini mengindikasikan adanya *Cmm* yang masuk ke dalam struktur benih akibat inokulasi buatan yang dilakukan. Sebelum dan sesudah inokulasi buatan, benih tomat juga terinfeksi oleh bakteri saprofit selain *Cmm* dengan tingkat infeksi 0.3×10^2 cfu mL⁻¹. Benih yang digunakan juga terinfeksi oleh cendawan, tetapi tingkat infeksinya tidak ditentukan.

Tabel 1. Tingkat infeksi benih tomat oleh *Cmm*, bakteri saprofit selain *Cmm* serta cendawan pada benih tomat cv. Marta sebelum dan sesudah perlakuan inokulasi buatan dengan *Cmm* SLK-11

Kondisi benih tomat	Tingkat infeksi terjadi pada (cfu mL ⁻¹)		
	<i>Cmm</i>	Bakteri saprofit lain	Cendawan
Sebelum inokulasi buatan :			
• Air bilasan benih	0	0.2×10^2	+
• Ekstrak benih	0	0.3×10^2	+
Setelah inokulasi buatan :			
(a) Tanpa sterilisasi			
• Air bilasan benih	TD	TD	TD
• Ekstrak benih	368.3×10^2	0.3×10^2	+
(b) Dengan sterilisasi			
• Air bilasan benih	0	0.2×10^2	-
• Ekstrak benih	0.7×10^2	0.2×10^2	-

TD : tidak ditentukan, (+) ada koloni cendawan, (-) tidak ada koloni cendawan yang tumbuh pada médium SCM (medium semi-selektif untuk menumbuhkan bakteri)

Skrining Daya Hambat Jenis Ekstrak Tumbuhan terhadap Cmm secara In Vitro

Dua puluh jenis minyak dan ekstrak tumbuhan yang diuji yang menunjukkan daya hambat cukup tinggi terhadap *Cmm* adalah ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh (Tabel 2). Larutan DMSO (kontrol negatif) tidak menghambat *Cmm* berarti daya hambat terhadap *Cmm* benar-benar akibat perlakuan benih.

Konsentrasi hambat minimal untuk ekstrak rizoma temulawak, minyak kayu kulit manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh berturut-turut adalah 0.25%, 1.0%, 1.0%, dan 0.25% (Tabel 3, Gambar 1). Empat jenis minyak dan ekstrak tersebut dipilih untuk mengeliminasi *Cmm* sebagai perlakuan benih pada percobaan berikutnya.

Uji Daya Hambat Ekstrak Tumbuhan terhadap Cmm pada Benih Terinfeksi

Ekstrak rizoma temulawak 5%, minyak kayu kulit manis 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak cengkeh 0.5% efektif mengeliminasi *Cmm* pada benih terinfeksi.

Tidak terdapat perbedaan penurunan jumlah populasi bakteri saprofit lain yang ada pada benih tomat bersama-sama *Cmm*, kecuali perlakuan minyak cengkeh (Tabel 4).

Penentuan Efektivitas Eliminasi Cmm dari Lot Benih Tomat Terinfeksi

Benih tomat terinfeksi diberi perlakuan *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0.5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, ekstrak rizoma temulawak 5%, minyak kayu kulit manis 5%, atau yang direndam dalam minyak cengkeh 0.5% selama 20 menit dapat mengeliminasi tingkat infeksi *Cmm* lebih dari 99%. Perendaman benih tomat terinfeksi dalam ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, minyak kayu kulit manis 5% tanpa *matriconditioning* mampu menurunkan tingkat infeksi *Cmm* 98% (Tabel 5).

Hasil percobaan juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan penurunan jumlah populasi bakteri saprofit, kecuali pada perlakuan *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0.5%. Fokus penelitian yang dilakukan adalah menguji efektivitas ekstrak tumbuhan untuk mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat.

Tabel 2. Skrining daya hambat dari 20 jenis minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap enam isolat *Cmm* secara *In Vitro*

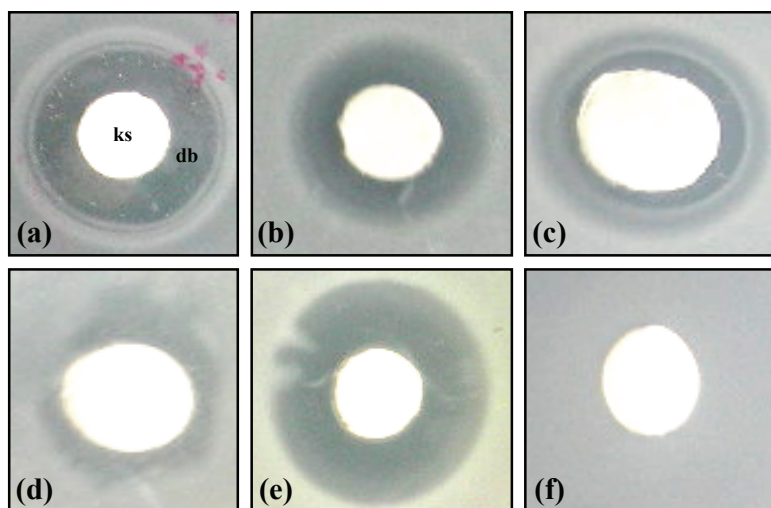
Jenis tanaman		Metode ekstraksi	Diameter (mm) daerah bening penghambatan pertumbuhan koloni isolat <i>Cmm</i>					
Nama Daerah	Nama Latin		MLG-65	KDR-68	RJL-74	SLK 11	CJR-45	AGM-7
Cengkeh	<i>Syzygium aromaticum</i>	Fr. Heksan	-	-	-	-	-	-
Kunyit	<i>Curcuma longa</i>	Fr. Heksan	-	-	-	-	-	-
Kencur	<i>Kaempferia galanga</i>	Fr. Heksan	-	-	-	-	-	-
Pala	<i>Myristica fragrans</i>	Fr. Heksan	-	-	-	-	-	12
Kulit kayu manis	<i>Cinnamomum burmannii</i>	Minyak	7.2	7.3	7.7	9.2	7.5	9.2
Temulawak	<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	Fr. Heksan	8.2	8.2	9.5	9.3	10.3	8.5
Mimba	<i>Azadirachta indica</i>	MeOH	-	-	-	-	-	-
Surian	<i>Toona sureni</i>	MeOH	-	-	-	7.8	-	-
Bringin sungsang	<i>Ficus deltoidea</i>	MeOH	-	-	-	-	-	-
Pluchea	<i>Pluchea indica</i>	MeOH	-	-	-	-	-	-
Sirih hutan	<i>Piper aduncum</i>	MeOH	7.3	-	8	7.8	8.7	8.2
Gambir	<i>Uncaria gambier</i>	Air	-	-	-	10.7	-	-
Bawang putih	<i>Allium sativum</i>	EtOH	-	-	-	-	-	-
Rutin	<i>Manihot utilisima</i>	MeOH	-	-	-	-	-	-
Bungo paik	<i>Thitonia diversifolia</i>	MeOH	-	-	-	-	-	-
Sirih	<i>Piper betle</i>	MeOH	-	-	-	7.5	-	-
D.Mahkota Dewa	<i>Phaleria macrocarpa</i>	EtOH	-	-	-	-	-	-
B.Mahkota Dewa	<i>Phaleria macrocarpa</i>	EtOH	-	-	-	-	-	-
Sereh wangi	<i>Cymbopogon nardus</i>	Minyak	-	-	-	-	-	-
Cengkeh	<i>Syzygium aromaticum</i>	Minyak	8.3	12.3	9.5	8	9	8,5
Kloramfenikol	-	-	17.3	16.2	19.5	19.7	17.3	18.3

Catatan: isolat MLG-65 dari Pujon, Malang; KDR-68 dari Matus, Kediri; RJL-74 dari Rejang Lebong, Bengkulu; SLK 11 dari Danau Kembar, Solok; CJR-45 dari Cianjur, Cipanas; dan AGM-7 dari Agam, Banuhampu. Perlakuan DMSO tidak berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan koloni semua isolat *Cmm*

Tabel 3. Penentuan konsentrasi minyak dan ekstrak tumbuhan yang efektif sebagai anti mikroba *Cmm* SLK-11 secara *In Vitro* dengan menggunakan metode difusi agar

Konsentrasi perlakuan	Diameter daerah bening (mm) akibat perlakuan minyak dan ekstrak tumbuhan *)			
	Temulawak	Kulit kayu manis	Sirih hutan	Minyak cengkeh
10.00%	12.7	17.5	15.2	12.8
5.00%	11.7	12.2	13.2	12.2
2.50%	11.5	8.7	10.5	11.5
1.00%	11.2	7.0	7.8	11.3
0.50%	9.8	0.0	0.0	10.0
0.25%	8.7	0.0	0.0	9.0
DMSO (2.5%)	0.0	0.0	0.0	0.0
Kloramfenikol (3 ug uL ⁻¹)	20.3	22.3	22.3	21.5

Keterangan: *) Angka pada kolom adalah rata-rata pengukuran diameter daerah bening (halo) dari aktivitas temulawak, kulit kayu manis, sirih hutan, dan minyak cengkeh terhadap *Cmm* SLK-11



Gambar 1. Hasil uji aktivitas anti mikroba dari minyak dan ekstrak tumbuhan didasarkan pada terbentuknya daerah bening (halo) dengan metode difusi agar. Terbentuknya bidang hambatan pada perlakuan (a) ekstrak rizoma temulawak terhadap *Cmm* isolat RJL-74, (b) minyak kulit kayu manis terhadap isolat SLK-11, (c) minyak cengkeh terhadap isolat CJR-45, (d) ekstrak daun sirih hutan terhadap isolat AGM-7, (e) kloramfenikol (K+) terhadap isolat MLG-65, dan (f) DMSO (K-) terhadap isolat KDR-68, yang tidak terbentuk bidang hambatan. ks: kertas saring, dengan penambahan minyak dan ekstrak tumbuhan sesuai perlakuan. db: daerah bening, bidang penghambatan pertumbuhan koloni *Cmm* oleh minyak dan ekstrak tumbuhan

Percobaan sebelumnya telah mengevaluasi pengaruh minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap perkecambahan benih tomat. Ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak cengkeh 0.5% dengan atau tanpa *matriconditioning* tidak berpengaruh negatif terhadap perkecambahan benih sedangkan *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5% bersifat menghambat perkecambahan benih tomat (Zainal, 2010). Hasil lengkap percobaan yang terkait dengan dampak perlakuan minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap kualitas fisiologis benih akan disajikan dalam laporan lain.

Penelitian lebih lanjut masih perlu dilakukan terkait dengan dampak negatif ekstrak tumbuhan terhadap perkecambahan benih tomat, pengembangan formulasi ekstrak tumbuhan untuk tujuan perlakuan benih secara komersial.

Pembahasan

Bakteri *Cmm* adalah *seedborne pathogen*, salah satu langkah yang efektif untuk pengendalian penyakit ini adalah dengan mengeliminasi *Cmm* dari benih. Hasil uji *in vitro* ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh terbukti dapat menghambat pertumbuhan koloni *Cmm*. Berdasarkan data eliminasi tersebut, diduga perlakuan benih dengan minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut akan efektif untuk diterapkan secara komersial untuk mengeliminasi *Cmm*.

Pengamatan yang dilakukan dalam percobaan sebelumnya, lot benih tomat komersial dari Indonesia yang terinfeksi *Cmm* secara alami mempunyai tingkat infeksi 0.1×10^2 hingga 1.25×10^2 cfu mL⁻¹ (Anwar *et al.*, 2004a).

Tabel 4. Daya hambat minyak dan ekstrak tumbuhan terpilih terhadap jumlah koloni *Cmm* isolat SLK-11 dan bakteri saprofit lainnya pada lot benih tomat terinfeksi

Konsentrasi (%)	Ekstrak temulawak		Minyak kulit kayu manis		Ekstrak daun sirih hutan		Minyak cengkeh	
	Σ koloni	Σ koloni	Σ koloni	Σ koloni	Σ koloni	Σ koloni	Σ koloni	Σ koloni
	<i>Cmm</i> *	saprofit*	<i>Cmm</i>	saprofit	<i>Cmm</i>	saprofit	<i>Cmm</i>	saprofit
0	391.7 a	4.3 a	375.0 a	4.7 a	368.3 a	4.3 a	371.7 a	4.3 a
0.25	20.3 b	4.0 a	TD	TD	TD	TD	15.0 b	4.0 a
0.5	16.0 bc	4.0 a	TD	TD	TD	TD	4.0 c	1.0 b
1	12.0 bc	2.3 a	24.3 b	4.3 a	19.7 b	4.0 a	4.0 c	1.0 b
1.5	TD	TD	TD	TD	TD	TD	4.0 c	0.0 b
2.5	8.0 c	2.0 a	8.0 c	4.3 a	14.3 c	4.0 a	TD	TD
5	4.0 c	2.0 a	3.7 d	2.3 a	5.0 d	2.7 a	TD	TD
10	4.0 c	2.0 a	3.7 d	2.0 a	5.0 d	1.0 a	TD	TD

Keterangan: * (10² cfu mL⁻¹).

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%.

TD ; tidak diamati

Tabel 5. Tingkat infeksi *Cmm* isolat SLK-11 dan bakteri saprofit selain *Cmm* pada benih tomat sebelum dan sesudah perlakuan benih serta persentase eliminasi *Cmm* oleh perlakuan benih

Perlakuan pada benih tomat terinfeksi <i>Cmm</i>	Bakteri patogen <i>Cmm</i>		
	Tingkat infeksi (cfu mL ⁻¹)	Persentase eliminasi *	Infeksi bakteri saprofit (cfu mL ⁻¹)
Temulawak 5%, 20 menit	5.0 x 10 ² b	98	2.7 x 10 ² ab
Tanpa perlakuan benih	373.7 x 10 ² a	0	4.3 x 10 ² a
Sirih hutan 5%, 20 menit	5.0 x 10 ² b	98	2.7 x 10 ² ab
Minyak cengkeh 0.5%, 20 menit	3.7 x 10 ² b	99	3.7 x 10 ² a
Matriconditioning plus temulawak 5%	3.3 x 10 ² b	99	2.3 x 10 ² ab
Matriconditioning plus sirih hutan 5%	3.0 x 10 ² b	99	3.3 x 10 ² a
Matriconditioning plus minyak cengkeh 0.5%	0.7 x 10 ² b	99	1.3 x 10 ² b
Matriconditioning plus kayu kulit manis 5%	2.3 x 10 ² b	99	2.7 x 10 ² ab
Matriconditioning	365.0 x 10 ² a	2	4.7 x 10 ² a
Kayu kulit manis 5%, 20 menit	4.0 x 10 ² b	98	3.0 x 10 ² a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%.

* Dihitung dengan rumus = $([T_0 - T_S] / T_0) \times 100\%$; T₀ = tingkat infeksi *Cmm* tanpa perlakuan benih dan T_S = tingkat infeksi *Cmm* dengan perlakuan benih.

Tingkat infeksi ini jauh lebih rendah daripada tingkat infeksi benih tomat yang diinokulasi buatan yaitu 368.3 x 10² cfu mL⁻¹, sehingga eliminasi total *Cmm* diharapkan dapat terjadi. Sebelum digunakan secara komersial perlu dievaluasi ada tidaknya pengaruh negatif ekstrak yang diuji terhadap perkecambahan benih. Adanya pengaruh negatif terhadap perkecambahan benih dapat menghilangkan kegunaan ekstrak uji tersebut untuk perlakuan benih secara komersial.

Bakteri *Cmm* diketahui dapat berada di permukaan, di bagian dalam kulit benih yang dipanen dari tanaman tomat terinfeksi penyakit kanker bakteri di lapangan. Inokulasi buatan pada benih tomat cv. Marta mampu mensimulasikan kondisi tersebut karena pada benih tomat hasil infeksi buatan berhasil dibuktikan bahwa *Cmm* tidak hanya dijumpai di permukaan benih tetapi juga di bagian dalam benih yang tidak terjangkau oleh perlakuan sterilisasi. Penetrasi *Cmm* ke bagian dalam benih tomat inokulasi buatan diduga masuk melalui hilum dan mikropil benih, karena permeabilitas

kulit benih yang tertinggi berada pada kedua bagian tersebut (Anwar *et al.*, 2004a).

Senyawa eugenol pada minyak cengkeh merupakan anti-mikroba dengan spektrum yang luas (Friedman *et al.*, 2002; Maidment *et al.*, 2006; Nurdin *et al.*, 2001) dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif (Burt, 2004; Arora and Keur, 1999; Dorman and Deans, 2001). Minyak cengkeh 0.25% telah menunjukkan daya hambat terhadap *Cmm* secara *in vitro* dengan metode difusi agar, tetapi untuk eliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi diperlukan konsentrasi lebih tinggi yaitu 0.5%. Minyak cengkeh 0.5% dengan atau tanpa *matriconditioning* tidak mampu mengeliminasi *Cmm* secara total dari benih terinfeksi. Ketidakkampuan minyak cengkeh 0.5% untuk mengeliminasi *Cmm* secara total, diduga terjadi karena (1) minyak cengkeh dalam perlakuan ini tidak dapat menjangkau *Cmm* yang ada di bagian dalam benih tomat atau (2) konsentrasi *Cmm* pada benih tomat hasil inokulasi buatan sangat tinggi. Jika perlakuan yang sama digunakan untuk mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat yang terinfeksi secara alami yang tingkat infeksiya jauh lebih rendah dibandingkan dengan inokulasi buatan, minyak cengkeh 0.5% dengan atau tanpa *matriconditioning* diduga akan dapat mengeliminasi *Cmm* hingga 100%.

Ekstrak daun sirih hutan, ekstrak rizoma temulawak, dan minyak kulit kayu manis kurang efektif mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi dibandingkan dengan minyak cengkeh. Diperlukan konsentrasi lebih tinggi dari ketiga ekstrak tersebut untuk mencapai tingkat penghambatan yang sama dengan minyak cengkeh. Konsentrasi yang lebih tinggi menuntut penyediaan minyak dan ekstrak tumbuhan yang lebih banyak, hal ini tidak diinginkan jika dikembangkan secara komersial. Penggunaan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi berpengaruh negatif terhadap perkecambahan benih. Efektivitas ekstrak tumbuhan diduga dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsentrasi bahan aktifnya, misalnya dengan memakai ekstrak hasil penyulingan.

Perbedaan daya hambat antara minyak cengkeh dengan ekstrak daun sirih hutan, ekstrak rizoma temulawak, atau minyak kulit kayu manis diduga akibat adanya perbedaan efektivitas antara bahan aktif eugenol pada minyak cengkeh, 2',6'-*dihydroxy-4'methoxychalcone* pada sirih hutan, *xanthorizol* pada temulawak, dan *cinnamaldehyde* pada kulit kayu manis. Eugenol mempunyai efektivitas paling tinggi dibandingkan dengan bahan aktif lainnya untuk mengeliminasi keberadaan *Cmm* secara *in vitro*.

KESIMPULAN

Ekstrak rizoma temulawak 0.25%, minyak kayu kulit manis 1%, ekstrak daun sirih hutan 1%, atau minyak cengkeh 0.25% mampu menghambat pertumbuhan *Cmm* secara *in vitro*. Penghambatan pertumbuhan *Cmm* pada benih terinfeksi diperlukan konsentrasi minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut lebih tinggi dari pada uji secara *in vitro*, yaitu ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak kulit kayu manis 5% dan minyak cengkeh

0.5%. Perlakuan menggunakan ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, atau minyak cengkeh 0.5% dengan atau tanpa *matriconditioning* menggunakan bubuk arang sekam mampu menurunkan tingkat infeksi *Cmm* pada benih terinfeksi buatan hingga 99%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian penelitian didanai oleh Hibah Bersaing XIV berjudul Pengelolaan Penyebaran Penyakit Kanker Bakteri, Penyakit Baru pada Tomat di Indonesia. Nomor 005/SP3/PP/DP2M/II/2006.01/2/2006. Kementerian Pendidikan Nasional RI, di bawah koordinasi Aswaldi Anwar.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, A., S. Ilyas, Sudarsono. 2004a. Deteksi bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada benih tomat komersial yang beredar di Indonesia. J. Perlindungan Tanaman Indonesia 10:74-86.
- Anwar, A., P.S. van der Zouwen, S. Ilyas, J.M. van der Wolf. 2004b. Bacterial cancer (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) of tomato in commercial seed produced in Indonesia. Plant Dis. 88:680.
- Anwar, A., Sudarsono, S. Ilyas. 2005. Perbenihan sayuran di Indonesia: Kondisi terkini dan prospek bisnis benih sayuran. Bul. Agron. 33:38-47.
- Arora, D.S., J. Keur. 1999. Antimicrobial activity of spices. Phytother Res. 13:616-618.
- Asie, K.V. 2004. *Matriconditioning* plus pestisida botani untuk perlakuan benih cabai terinfeksi *Collectotrichum capsici*: Evaluasi mutu benih selama penyimpanan. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Basim, E., H. Basim, E.R. Dickstein, J.B. Jones. 2004. Bacterial cancer caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean Region of Turkey. Plant Dis. 88:1043-1048.
- Biswas, K., I. Chattopadhyay, R.K. Banerjee, U. Bandyopadhyay. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Sci. 82:1336-1345.
- Bowers, J.H., J.C. Locke. 2004. Effect of formulated plant extracts and oil on population density of *Phytophthora nicotiana* in soil and control of *Phytophthora blight* in the greenhouse. Plant Dis. 88:11-16.
- Brandl, F. 2001. Seed treatment technologies, evolving the achieve crop genetic potential. p.3-18. In A.J. Biddle (ed.) Seed Treatment Challengers and

- Opportunities. Symposium Proceedings no 76, North Warwickshire.
- Burt, S. 2004. Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. Int. J. Food Microbiol. 94:223-53.
- Dorman, H.J.D., S.G. Deans. 2001. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88:308-316.
- Friedman, M., P.R. Henika, R.E. Mandrell. 2002. Bacterial activities of plant essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric*. J. Food Prot. 65:1545-60.
- Ilyas, S. 2006. Review seed treatments using matricconditioning to improve vegetable seed quality. Bul. Agron. 34:124-132.
- Ilyas, S., G.A.K. Sutariati, F.C. Suwarno, and Sudarsono. 2002. *Matricconditioning* improves the quality and protein level of medium vigor hot pepper seed. Seed Tech. 24:65-75.
- Maidment, C., A. Dyson, L. Hayson. 2006. A study into the antimicrobial effects of cloves (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) using disc-diffusion assay. Nutrition and Food Sci. 36:225-230.
- Nurdin, A., A. Mulyana, H. Suratno. 2001. Isolation eugenol dari minyak daun cengkeh skala pilot plant. J. Sains dan Teknologi Indonesia 3:58-62.
- Park, J. H., M. J. Kim, K. K. Park, H.O. Kim, J.K. Hwang, W.Y. Chung. 2003. Chemopreventive effect of xanthorhizol from *Curcuma xanthorrhiza*. J. Korean Assoc. Cancer Prevention 8:91-97.
- Paul, P.K., P.D. Sharma. 2002. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. Physiol. Mol. Plant Pathol. 61:3-13.
- Pino, J.A., R. Marbot, A. Bello, A. Urquiola. 2004. Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq and *Piper aduncum* L. from Cuba. J. Essent. Oil Res. 16:124-126.
- Rali, T., S.T.Wossa, D.N. Leach, P.G. Waterman. 2007. Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* L. and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. Molecules 12:389-394.
- Rukayadi, Y., D. Yong., J.K. Hwang. 2006. *In vitro* anticandidal activity of xanthorhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. J. Antimicrobial Chemotherapy 57:1231-1234.
- Santos, T., E.C. Moreira, D.L. Kapan, M.A.C. Mierelles, M.N. Rossi-Bergmann. 1999. Selective effect of 2',6'-dehydroxy-4'methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. Antimicrob. Agents. Chemother. 43:1234-1241.
- Schaad, N.W., J.B. Jones, W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press. St. Paul. Minnesota.
- Sutariati, G.A.K., K.V. Asie, S. Ilyas, Sudarsono. 2005. Efektivitas daya hambat pestisida nabati terhadap pertumbuhan koloni *Colletotrichum capsici* secara *in vitro*. Agriplus 15:75-82.
- Yunitasari, M., S. Ilyas. 1994. Possible use of several solid carriers for matricconditioning of pepper (*Capsicum annuum* L.). Keluarga Benih 5:29-34.
- Zainal, A. 2010. Penyebaran dan karakterisasi molekuler *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* serta perlakuan benih untuk eliminasi *Cmm* pada tomat. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zainal, A., A. Anwar, U. Khairul, Sudarsono. 2008. Distribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in various tomato production centers in Sumatera and Java. Microbiology Indonesia 2:63-68.