

EFEKTIVITAS DAUN BELIMBING WULUH UNTUK MENGHAMBAT KONTAMINASI PADA PERTUMBUHAN BIJI KACANG HIJAU SECARA *IN VITRO*

Salissatul Husniah¹⁾, Triastuti Rahayu²⁾,

Mahasiswa¹⁾, Staf Pengajar²⁾,

Program Studi Pendidikan Biologi,

Skripsi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas

Muhammadiyah Surakarta, April 2016

Email: salissatulhusniah@gmail.com

Abstrak

Masalah utama dalam teknik perbanyakan tanaman kultur jaringan tanaman adalah kontaminasi oleh bakteri atau jamur, untuk mengatasi kontaminasi ini sering menggunakan Plant Preservative Mixture (PPM) sebagai antimikroba. Buah dan daun belimbing wuluh mengandung golongan senyawa oksalat, fenol, flavonoid, tanin, sulfur, dan asam format yang mengandung banyak manfaat salah satunya dapat menjadi antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektivitas ekstrak buah dan daun belimbing wuluh dapat menghambat kontaminasi pada pertumbuhan biji kacang hijau secara *in vitro*. Rancangan penelitian ini dengan Rancangan Acak Lengkap 2 faktor yaitu: faktor 1: Buah belimbing wuluh (E1); daun belimbing wuluh (E2) dan faktor 2 :Konsentrasi ekstrak 15% (K2) ; konsentrasi ekstrak 30% (K3). Ekstraksi buah dan daun belimbing wuluh dilakukan dengan metode infundasi menggunakan pelarut air (1:10) temperature pelarut air harus mencapai suhu 90°C selama 15 menit dengan bantuan waterbath. Parameter yang diamati selama 5 hari dari tanaman biji kacang hijau adalah persentase media tidak kontaminasi, tinggi batang, jumlah akar, dan kondisi kecambah. Kondisi kecambah pada E1K1, E2K2, E2K2, dan E2K3 adalah normal. Ekstrak daun belimbing wuluh konsentrasi 15% efektif untuk mencegah kontaminasi sebesar 70 % pada pertumbuhan biji kacang hijau secara *in vitro*.

Kata kunci : *in vitro*, buah dan daun belimbing wuluh, antimikroba

1. PENDAHULUAN

a. Latar Belakang

Tanaman dapat dikembangkan secara generatif dan vegetatif. Teknik perbanyakan tanaman vegetatif salah satunya adalah dengan cara kultur jaringan tanaman. Kultur jaringan tanaman adalah metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkan dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap dengan kualitas yang baik.

Jenis dan komposisi media sangat menentukan biaya produksi dan keberhasilan perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Ada beberapa jenis media seperti media Murashige-Skoog (MS) yang digunakan untuk pertumbuhan biji, media Vacin Went (VW) untuk anggrek, dan media Woody Plant Medium (WPM) untuk tanaman berkayu.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya masalah utama dalam pembiakan dengan cara kultur jaringan tanaman adalah sering terjadi kontaminasi, akibatnya eksplan yang berupa biji maupun potongan dari tanaman tidak tumbuh normal dan akan membusuk. Untuk mengatasi kontaminasi ini sering digunakan Plant Preservative Mixture (PPM) sebagai antimikroba yang merupakan salah satu bahan biosida dalam kultur cair golongan isotiazolon (Sharaf Eldin & Weathers, 2006). PPM terdiri dari campuran metilkloroisotiazolinon dan metilisotiazolinon yang berfungsi mencegah atau mengurangi kontaminasi mikroba. Aplikasi penambahan PPM dalam kultur jaringan merupakan salah satu faktor yang menyebabkan tingginya biaya produksi. Hal ini dikarenakan harga PPM sintetik cukup mahal dengan harga Rp. 65.000,- / ml dan tidak selalu ready stock, oleh karenanya diperlukan pengganti PPM alami yang dapat digunakan untuk menggantikan peran PPM sintetik. PPM alami dapat diperoleh dari berbagai buah-buahan, salah satu diantaranya adalah buah dan daun belimbing wuluh yang memiliki kandungan tanin di dalamannya (Ummah, 2010).

Penelitian (Jannah dkk, 2010) menyebutkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh yang diujikan secara *in vitro* pada bakteri mempunyai potensi sebagai antibakteri. Uji aktivitas bakteri *M. luteus* diketahui zona hambat pada 0,1-0,8 mg/ml menunjukkan respon hambat, sedangkan konsentrasi 1 mg/ml menunjukkan respon bunuh terhadap pertumbuhan bakteri.

Hasil uji prapenelitian aktifitas antibakteri daun dan buah belimbing wuluh dengan pelarut air 1: 10 terhadap pertumbuhan biji kacang hijau dalam media kultur jaringan tanaman menunjukkan bahwa pada konsentrasi 30 % dan 60 % ekstrak daun dan buah belimbing wuluh dapat mencegah kontaminasi namun pada konsentrasi 60% pertumbuhan kecambah terhambat, sehingga hasil paling baik ditunjukkan pada perlakuan dengan konsentrasi ekstrak buah dan daun belimbing wuluh sebesar 30 % ditunjukkan dengan tidak terjadinya kontaminasi dan pertumbuhan biji kacang hijau baik.

Senyawa-senyawa dalam buah dan daun belimbing wuluh ini dapat dipisahkan melalui proses sederhana dengan metode infundasi yaitu dengan cara perebusan. Infundasi merupakan metode ekstraksi dengan pelarut air. Pada saat proses infundasi berlangsung, temperatur pelarut air harus mencapai suhu 90°C selama 15 menit. Rasio berat bahan dan air adalah 1 : 10, artinya jika berat bahan 100 gram maka volume air sebagai pelarut adalah 1000 ml (Ditjen POM, 1995).

Penggunaan ekstrak tanaman buah dan daun belimbing wuluh dalam media kultur jaringan tanaman, diharapkan tidak mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan digunakan biji kacang hijau untuk pertumbuhan. Apabila pertumbuhan biji kacang hijau normal dan kontaminasi dapat dihambat, maka ekstrak tanaman buah dan daun belimbing wuluh dapat digunakan sebagai pengganti PPM.

Untuk mengetahui efek pertumbuhan eksplan dengan ekstrak daun dan buah belimbing wuluh, pada penelitian ini digunakan media MS yang sudah ditambahkan ekstrak belimbing wuluh untuk menumbuhkan biji kacang hijau pada media kultur. Berdasarkan uraian diatas maka mendorong peneliti melakukan penelitian tentang “Efektivitas Ekstrak Buah dan Daun Belimbing Wuluh untuk Mencegah Kontaminasi Pada Pertumbuhan Biji Kacang Hijau Secara *In vitro*”

b. Rumusan Masalah

Bagaimana efektifitas ekstrak buah dan daun belimbing wuluh dapat menghambat kontaminasi pada pertumbuhan biji kacang hijau secara *in vitro*?

c. Tujuan

Mengetahui efektifitas ekstrak buah dan daun belimbing wuluh untuk menghambat kontaminasi pada pertumbuhan biji kacang hijau secara *in vitro*?

d. Manfaat Penelitian

Sebagai referensi mengenai efektifitas buah dan daun belimbing wuluh untuk mencegah kontaminasi pada perkecambahan biji kacang hijau secara *in vitro*

2. METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai Maret tahun 2016. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan dua faktor perlakuan: jenis ekstrak dan konsentrasi.

Alat yang digunakan adalah *Laminar Air Flow* (LAF), Erlenmeyer (*Pyrex*) 2000 ml, beaker glass (*Pyrex*) 200 ml, handsprayer, pinset, hot plate/ magnetic stirrer, pengaduk kaca, gelas ukur (*Pyrex*) 100 ml, autoclave, timbangan digital, media ukur, mikropipet, korek, lampu bunsen, pH indikator, pH stick dan waterbath. Sedangkan bahan yang digunakan adalah buah belimbing wuluh, daun belimbing wuluh, biji kacang hijau, tissue, kertas payung, aluminium foil, plastik *wrap*, alcohol 70%, spiritus, media MS (*Murashige & Skoog*), *aquadest*, gula, agar-agar, dan PPM (*Plant Preservative Mixture*).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan dua faktor perlakuan yaitu: jenis ekstrak, dan konsentrasi. Cara pencarian ekstrak buah dan daun belimbing wuluh menggunakan metode infundasi. Biji kacang hijau ditanam di dalam media media kultur yang berisi media ½ MS dan tambahan ekstrak buah dan daun belimbing wuluh, serta diberikan campuran PPM untuk kontrol positif. Data dianalisis menggunakan analisis deskriptif kualitatif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1 data persentase media yang tidak terkontaminasi dan pertumbuhan kecambah biji kacang hijau

Perlakuan	% Media yang tidak terkontaminasi	Rata-rata pertumbuhan kecambah biji kacang hijau			
		Batang (cm)	Jumlah Akar	Jumlah Daun	Kondisi Kecambah
(-) MS	40	8	5,25	2	Normal
(+) PPM	100	7,98	4,5	2	Normal
Buah 15%	0	-	-	-	-
Buah 30%	0	-	-	-	-
Daun 15%	70	7,97	5,71	2	Normal
Daun 30%	40	7,45	4,25	2	Normal

Dari tabel 1 menunjukkan bahwa persentase media yang tidak terkontaminasi pada media yang telah diberikan ekstrak daun belimbing wuluh lebih besar daripada media yang telah diberikan ekstrak buah belimbing wuluh. Ekstrak daun belimbing wuluh dapat menghambat kontaminasi yang lebih baik daripada ekstrak buah belimbing wuluh. Dari tabel 1 juga dapat dilihat pertumbuhan kecambah biji kacang hijau pada tiap perlakuan selama 5 hari pengamatan, tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan E1K2 (media MS dan ekstrak buah belimbing wuluh 15%) dan E1K3 (media MS dan ekstrak buah belimbing wuluh 30%) dari hari ke 1 hingga hari ke 5 terus mengalami kontaminasi media yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, namun eksplan yang ada di dalamnya tetap tumbuh normal walaupun dengan kondisi batang yang kurus, batang berwarna pucat, dan bentuk batang yang pendek. Sedangkan kondisi kecambah pada perlakuan E2K1 dan E2K2 memiliki kondisi kecambah normal dengan organ tanaman yang baik. Ciri-ciri kecambah yang normal terlihat plumula tumbuh dengan sempurna dengan warna daun yang hijau dan tumbuh baik. Pada hipokotil atau calon batang tumbuh dengan baik tanpa ada kerusakan pada jaringannya, kotiledon yang ditunjukkan juga terlihat sempurna tidak terlihat lemas atau layu. Hal ini sesuai dengan pendapat Purnobasuki (2011) kecambah yang normal ialah kecambah yang memiliki perkembangan sistem perakaran yang baik terutama akar primer dan akar skunder. Kecambah normal juga dapat menunjukkan hipokotil yang baik sempurna tanpa ada kerusakan pada jaringan. Plumula yang sempurna dengan daun yang hijau dan tumbuh baik di dalam atau muncul dari koleoptil, dan satu kotiledon yang dimilikinya. Sedangkan kecambah abnormal ialah kecambah yang rusak, tanpa kotiledon, embrio yang pecah dan akar primer yang pendek, atau bentuknya yang cacat, perkembangannya lemah atau kurang seimbang dari bagian yang penting, plumula yang terputar, hipokotil, epikotil, kotiledon yang membengkak, akar yang pendek.

Berdasarkan hasil dari tabel 1 menunjukkan bahwa pada perlakuan E2K1 (kontrol +) memiliki jumlah persentase media yang tidak terkontaminasi terbesar yaitu 100% yang artinya keseluruhan media media tidak terkontaminasi. Pada perlakuan ini media MS ditambahkan dengan 1 ml/ 2 liter media PPM yang berperan sebagai kontrol + pada setiap perlakuan, sedangkan E1K1 merupakan kontrol negatif. Pada perlakuan E1K1 media MS tidak diberikan tambahan PPM maupun ekstrak buah atau daun belimbing wuluh, untuk persentase yang tersisa pada perlakuan ini adalah 40%.

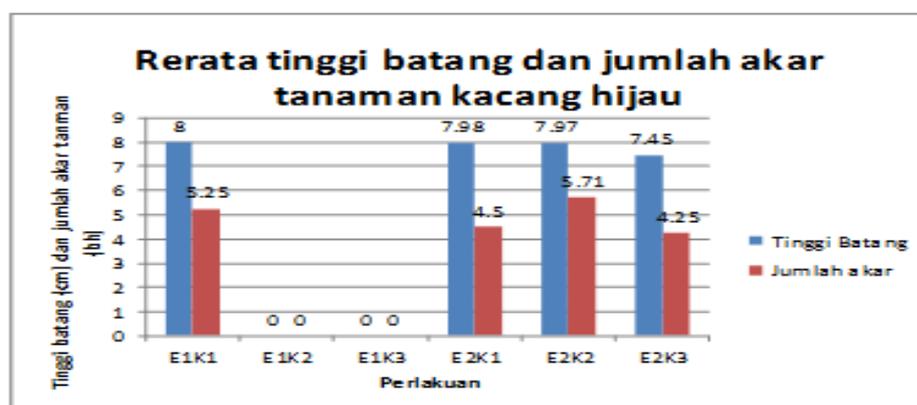
Pada penelitian ini dilakukan perbandingan dua perlakuan ekstrak yaitu ekstrak buah belimbing wuluh dan ekstrak daun belimbing wuluh. Perbandingan yang pertama ialah perlakuan E1K2 yang berupa media MS dengan tambahan ekstrak buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 15 % dan E1K3 dengan konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh 30%. Ekstrak buah belimbing wuluh dari dua perlakuan konsentrasi yang berbeda yakni 15% dan 30% keduanya tidak dapat menghambat pertumbuhan kontaminasi baik oleh jamur maupun bakteri hal ini ditunjukkan dengan tidak ada satu pun media media tanam yang tidak terkontaminasi dari keduanya dan banyak media yang ditumbuhi oleh jamur dan bakteri (Tabel 1).

Perbandingan yang kedua yaitu perlakuan E2K2 yang berupa media dengan tambahan ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 15 % dan E2K3 dengan konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh 30% dimana keduanya mampu menghambat pertumbuhan kontaminasi baik oleh jamur maupun bakteri. Dari gambar 1 dapat diketahui persentase media yang tidak terkontaminasi pada perlakuan E2K2 sebesar 70% sedangkan pada perlakuan E2K3 hanya 40%. Hal ini sekaligus memberikan informasi bahwa konsentrasi paling baik untuk menghambat kontaminasi pada media tanam kultur jaringan tanaman dengan penambahan konsentrasi ekstrak

daun belimbing wuluh sebesar 15%. Senyawa aktif yang memberikan sifat antibakteri pada daun belimbing wuluh adalah senyawa tannin, karena tannin adalah senyawa polar dan dimungkinkan larut dalam pelarut air. Jenis senyawa tannin pada daun belimbing wuluh adalah flavan-3,6,7,4',5'-pentaol atau flavan-3,7,8,4',5'-pentaol. (Hayati *et al.*, 2010). Nurliana (2006) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa kadar tanin pada daun belimbing wuluh sebesar 1,6% sedangkan menurut Ummah (2010) kadar tanin yang tinggi pada daun belimbing wuluh muda sebesar 10,92%.

Dalam kultur jaringan tanaman masalah utama yang dihadapi adalah sering terjadinya kontaminasi pada media tanam yang ditumbuhi jamur maupun bakteri dalam penelitian ini ada beberapa faktor yang mempengaruhi antara lain adalah eksplan. Eksplan yang digunakan dibeli dari pasar dalam keadaan terbuka tidak dibungkus dalam plastik sehingga kemungkinan besar eksplan diinggapi banyak jamur maupun bakteri yang tidak mati pada saat dilakukan sterilisasi.

Faktor yang kedua yaitu sterilitas ruangan juga sangat menentukan terhadap kontaminasi. ruangan yang digunakan dalam penelitian ini juga digunakan untuk penelitian lain yang menggunakan jamur dan bakteri dalam waktu yang bersamaan sehingga kemungkinan besar ruangan yang sudah steril dapat saja berubah menjadi tidak steril dengan adanya bakteri maupun jamur yang akan digunakan oleh peneliti lainnya, selain itu keluar masuknya praktikan mungkin saja membawa bakteri dari luar ruangan sehingga dapat menyebabkan adanya kontaminasi. Kontaminasi disebabkan oleh jamur, bakteri dan cendawan. Kontaminasi oleh jamur terlihat jelas pada media, media dan eksplan diselimuti oleh spora berbentuk kapas berwarna putih, sedangkan kontaminasi oleh bakteri, pada eksplan terlihat lendir berwarna putih hingga kekuningan sebagian lagi melekat pada media membentuk gumpalan yang basah (Nisa dan Rodinah, 2005).



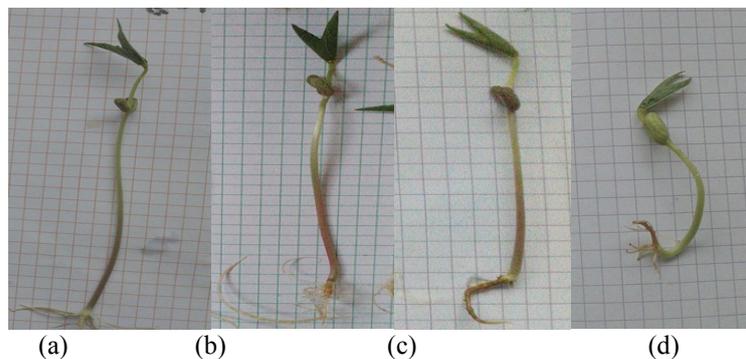
Gambar 3 Histogram tinggi batang dan jumlah akar tanaman kacang hijau

Berdasarkan gambar 3 menunjukkan pertumbuhan tinggi tanaman biji kacang hijau pada semua jenis perlakuan nampak bervariasi. Perlakuan perbedaan media tanam berupa ekstrak buah belimbing wuluh, ekstrak daun belimbing wuluh, dan media kontrol (-) maupun kontrol (+) berpengaruh terhadap pertumbuhan tinggi biji kacang hijau, di mana rerata tinggi tanaman pada perlakuan kontrol (-) E1K1 (media MS) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu mencapai 8 cm, walaupun tanaman memiliki batang yang tinggi tetapi batang terlihat pucat dan kurus (Gambar 4 a).

Dari gambar 3 menunjukkan perbedaan media tanam berupa ekstrak buah belimbing wuluh, ekstrak daun belimbing wuluh, dan media kontrol (-) maupun kontrol (+) berpengaruh terhadap pertumbuhan jumlah akar biji kacang hijau, di mana rerata jumlah akar tanaman pada perlakuan E2K2 (media MS ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 15%) lebih besar dibandingkan dengan perlakuan lainnya, sedangkan rerata jumlah akar terendah pada perlakuan E2K3 yaitu media dengan penambahan ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 30% (Gambar 3).

Dari gambar 3 menunjukkan perbandingan rata-rata tinggi batang dan jumlah akar tanaman kacang hijau pada tiap perlakuan memiliki tinggi batang dan jumlah akar yang beragam. Hal ini sesuai dengan pendapat Purnobasuki (2011) yang menyatakan bahwa setiap biji yang dikecambahkan ataupun yang diujikan tidak selalu persentase pertumbuhan kecambahnya sama. Ada beberapa faktor yang menyebabkan benih berkecambah normal, abnormal, dan benih tidak tumbuh sama sekali. Faktor tersebut dikemukakan oleh Sutopo (2010), beberapa faktor yang mengakibatkan benih tidak tumbuh diantaranya benih yang dipilih adalah benih yang

diambil dari buah yang telah jatuh hingga benih itu pecah dan keadaan kulit buah dalam keadaan pecah atau terbuka. Benih biji kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini berasal dari pasar dalam keadaan yang sudah terbuka dan terkena udara bebas begitu saja sehingga benih dalam keadaan seperti ini telah mengalami kontaminasi oleh bakteri, cendawan, virus maupun nematoda bahkan mungkin telah tersentuh oleh binatang yang memiliki bakteri atau penyakit lainnya. Kebanyakan patogen yang terbawa oleh benih menjadi aktif setelah benih disebar atau disemaikan. Sebagai akibatnya benih menjadi busuk atau terjadi “damping off” sebelum atau sesudah benih berkecambah.



Gambar 4 Keterangan: (a) E1K1, (b) E2K1, (c) E2K2, (d) E2K3
E1K1 : Media MS (kontrol negatif)
E2K1 : Media MS dan PPM (kontrol positif)
E2K2 : Media MS dan ekstrak daun belimbing wuluh 15%
E2K3 : Media MS dan ekstrak daun belimbing wuluh 30%

Pada gambar 3 menunjukkan rata-rata jumlah akar paling rendah terdapat pada perlakuan E2K3 hal ini disebabkan oleh kecambah yang mengalami kerusakan yang menyebabkan batang dan akarnya pendek pada gambar 4 d). Kondisi kecambah normal pada gambar (4 a), tetapi kondisi batang panjang namun sangat kurus dan warna batang lebih pucat.

Parameter pertumbuhan vegetative yang ketiga adalah rerata jumlah daun. Hasil analisis jumlah daun tanaman biji kacang hijau pada semua jenis perlakuan perbedaan media tanam berupa ekstrak buah belimbing wuluh, ekstrak daun belimbing wuluh, dan media control (-) maupun control (+) tidak berpengaruh terhadap jumlah daun tanaman kacang hijau dimana rerata jumlah daun tiap perlakuan sama.

4. SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Ekstrak daun belimbing wuluh konsentrasi 15% efektif untuk mencegah kontaminasi sebesar 70% pada perkecambahan biji kacang hijau secara *in vitro* dan pertumbuhan biji kacang hijau normal.

Saran

Perlu dilakukan uji lanjut mengenai buah dan daun belimbing wuluh ini kaitannya dengan sebagai antibakteri. Dalam proses penelitian perlu memperhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi kandungan antibakteri, sehingga antibakteri tidak mudah hilang. Dalam proses pengekstrakan buah maupun daun belimbing wuluh sebaiknya dijadikan dalam bentuk serbuk agar dapat lebih mudah digunakan.

5. DAFTAR PUSTAKA

1. Ditjen, pom. (1995). *Acuan sediaan herbal volume kelima, 3-7*. Direktorat jendral pom. Jakarta: departemen kesehatan republik indonesia.
2. Jannah, A., Hayati EK, Mukhlisoh W. (2010). Efektivitas Antibakteri Ekstrak Akuades dan Ekstrak Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) secara *In Vitro*. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam*. Bandung: ITB.
3. Nisa, C & Rodinah. (2005). Kultur Jaringan Beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa paradisiaca L.*) dengan Pemberian Campuran NAA dan Kinetin. *Bioscientiae*. Vol. 2 No. 2: 23-36.

4. Purnobasuki, H. (2011). *Perkecambahan*. Jakarta: Grafindo.
5. Sharaf, E. MA., & Weathers, P.(2006). Movement and containment of microbial contamination in the nutrient mist bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42, 553-557.
6. Sitompul, S. M., & Guritno, B. (1995). *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. hal. 24.
7. Sutopo, L. (2010). *Teknologi Benih*. Jakarta. Hlm. 2-3.
8. Ummah. Mk. (2010). Ekstraksi Dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Kajian Variasi Pelarut). *Skripsi*. Malang: Kimia UIN Malang.