

Research Articles

Pengaruh Rasio Kitosan-Sodium Tripolifosfat Terhadap Pengendalian Antraknosa (*Colletotrichum gloeosporioides*) Pada Mangga Kultivar Manalagi

Y. Suryadi^{1*}, Dwi N. Susilowati², dan I.M. Samudra¹

¹ Lab. Biokimia, BB Biogen, Jl Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

² Lab. Mikrobiologi, BB Biogen, Jl Tentara Pelajar 3A Bogor 16111

Received 9 Mei 2020; Accepted 14 Agustus 2020; Published 7 September 2020

Keyword:

Anti fungi;
B. cepacia E76;
 Low molecular weight;
 Chitosan;
 Chitinase

ABSTRACT:

Anthraxnose disease caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* is one of the most important diseases on fruit trees. Chitosan material have been applied to many different application fields including disease biocontrol because of its biocompatible and biodegradable effect. This research was aimed to synthesize low molecular weight chitosan (LMWC) which prepared via enzymatic process using a bacterium *Burkholderia cepacia* E76 and ionic gelation method, using sodium tripolyphosphate (NaTPP), and to test their activity against *C. gloeosporioides* on mangoes fruits. In this study the effect of concentration and volume ratio of LMWC : NaTPP was determined based on particle characteristics, i.e particle size, polydispersity index, zeta potential and FTIR structure. The results showed that LMWC could be synthesized by means of enzymatic hydrolysis using chitinase originated from *B. cepacia* E76. The optimal nanoparticle conditions was obtained by concentration of 0.3% LMWC, 0.1% TPP with volume ratio 5 : 1, stirring for 30-60 min incubation with the particle size of 126.2 nm and ZP value of 25.5 ± 6.1 mV. LMWC and nano chitosan product could be evidenced by FTIR analysis. Nano chitosan could inhibit the growth of *C. gloeosporioides* ranging from 61.28 – 96% under *in vitro* test. The result of *in vivo* test on manggoes fruit cv Manalagi, showed that chitosan nano particle could effectively inhibit the growth of anthracnose (74.5%) at concentration of 0.3% LMWC, and 0.1% NaTPP with ratio 5:2 compared with control. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University

Kata Kunci:

Anti jamur;
B. cepacia E76;
 Bobot molekul rendah;
 Kitosan;
 Kitinase

ABSTRAK:

Penyakit antraknosa yang disebabkan oleh jamur *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan salah satu penyakit paling penting pada mangga. Kitosan telah diterapkan pada berbagai bidang termasuk pengendalian hayati penyakit karena sifatnya yang kompatibel dan mudah terurai. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis kitosan bobot molekul rendah (KBMR) yang disiapkan melalui proses enzimatis menggunakan bakteri *Burkholderia cepacia* E76 dan metode gelasi ionik, menggunakan natrium tripolifosfat (NaTPP), serta untuk menguji aktivitas nya terhadap *C. gloeosporioides* pada buah mangga. Dalam penelitian ini pengaruh konsentrasi dan rasio volume KBMR: NaTPP ditentukan berdasarkan karakteristik partikel, yaitu ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan struktur FTIR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa KBMR dapat disintesis dengan cara hidrolisis enzimatis menggunakan kitinase yang berasal dari *B. cepacia* E76. Kondisi partikel nano optimal diperoleh dengan konsentrasi 0,3% KBMR, 0,1% NaTPP dengan rasio volume 5: 1, pengadukan selama 30-60 menit inkubasi dengan ukuran partikel 126,2 nm dan nilai ZP sebesar $25,5 \pm 6,1$ mV. Produk KBMR dan nano kitosan dapat dibuktikan dengan analisis FTIR. Nano kitosan dapat menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* dengan kisaran 61,28 – 93,75% pada uji *in vitro*. Hasil uji *in vivo* pada buah mangga kultivar Manalagi, menunjukkan bahwa partikel nano kitosan efektif menghambat pertumbuhan antraknosa (74,5%) pada konsentrasi 0,3% KBMR, dan 0,1% NaTPP rasio 5: 2 dibandingkan kontrol. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University

* Corresponding author.

E-mail address: yshid@yahoo.co.uk

PENDAHULUAN

Komoditas hortikultura terutama buah mangga memiliki prospek yang baik, jika dikembangkan secara intensif dalam skala agroindustri karena peluang pasar buah juga meningkat seiring dengan tingkat komunitas masyarakat[1].

Salah satu kendala dalam budidaya mangga adalah adanya penyakit antraknosa yang disebabkan oleh jamur patogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [2]. Penyakit ini biasanya terjadi pada periode pasca panen walaupun serangan sudah dimulai sejak di lapangan sehingga menurunkan kuantitas dan kualitas buah. Jamur *C. gloeosporioides* dikenal sebagai jamur yang polifag, dimana banyak komoditas buah-buahan lainnya juga dapat terinfeksi jamur ini. Gejala serangan pada buah berupa bercak coklat atau hitam, sedikit cekung dan seringkali bercak terlihat pada pangkal buah [3]. Kerugian serangan penyakit tidak hanya terhadap kuantitas tetapi juga kualitas di mana buah yang terinfeksi menjadi tidak layak untuk konsumsi; Oleh karena itu, perlu dikaji alternatif penghambat penyakit antraknosa yang efektif, murah dan ramah lingkungan.

Sampai saat ini, untuk mengurangi kerugian akibat penyakit antraknosa (baik sebagai preventif maupun kuratif), penggunaan fungisida sintetik paling banyak digunakan dalam perlindungan tanaman, tetapi hal ini bisa menyebabkan resistensi patogen terhadap beberapa residu fungisida (benomyl, quintozen) pada hasil pertanian, dan biaya tinggi [4]. Oleh karena itu, alternatif pengendalian untuk mengurangi intensitas penyakit sebagai metode perlindungan tanaman yang lebih berkelanjutan dan aman bagi konsumen perlu dikembangkan [5].

Pendekatan terpadu dengan memasukkan beberapa metode pengendalian, yang ramah lingkungan, aman dan relatif murah sangat dianjurkan untuk mendukung pengendalian penyakit. Salah satu penghambat penyakit antraknosa yang ramah lingkungan, yaitu kitosan. Kitosan adalah polisakarida yang terdiri dari glukosamin dan N-asetilglukosamin yang berfungsi untuk menginduksi respons resistensi tanaman terhadap infeksi patogen [6]. Kitosan

dapat mengurai kitin, unsur utama dinding sel jamur [7].

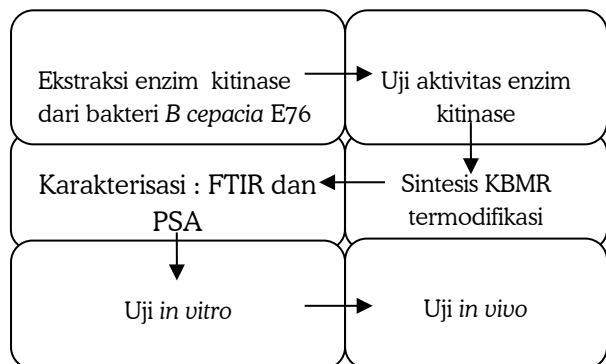
Partikel nano kitosan telah digunakan dalam berbagai aplikasi, termasuk dalam aplikasi farmasi, dan pengendali hayati penyakit karena memiliki luas permukaannya yang tinggi dan sifat aktivitas anti-jamur [8; 9]). Tujuan pembuatan nanopartikel, antara lain, meningkatkan stabilitas senyawa aktif terhadap degradasi lingkungan. Selain itu, modifikasi ukuran partikel dan sifat permukaan, bertujuan untuk mengoptimalkan efek terapi obat [10;11]). Mekanisme antijamur kitosan dapat terjadi pada tingkat ekstraseluler dan intraseluler [12]. Kelebihan kitosan adalah bersifat anti mikroba, penyembuh luka, tidak beracun, murah, biokompatibel, mudah terurai secara biologis, dan larut dalam air [13]. Efektivitas kitosan sebagai fungisida dapat ditingkatkan dengan mengurangi ukuran partikel menjadi ukuran nano yang disebut partikel nano kitosan. Partikel nano juga dapat didefinisikan sebagai sistem koloidal submikron ($<1 \mu\text{m}$).

Laporan tentang aktivitas antijamur partikel nano kitosan terhadap patogen mangga terutama penyakit antraknosa (*C. gloeosporioides*) relatif masih terbatas [14]. Aktivitas partikel nano kitosan sangat dipengaruhi oleh beberapa parameter seperti suhu, waktu pengadukan, konsentrasi, pH, pelarut, jenis jamur, dan berat molekul kitosan, sehingga perlu untuk menentukan formula yang tepat dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan formula nano kitosan dengan karakteristik terbaik untuk mengendalikan penyakit antraknosa melalui pengujian *in vitro* pada media PDA dan, *in vivo* pada mangga kultivar Manalagi. Dalam tulisan ini, dilaporkan nano kitosan yang diperoleh dengan perlakuan beberapa konsentrasi KBMR dengan gelas ionik. Selain itu, dijelaskan perbedaan karakteristik partikel sebagai anti-jamur dalam hal morfologi ukuran dan daya hambat.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi BB Biogen dengan melakukan aktifitas perbanyakan isolat E76 koleksi Biogen CC, ekstraksi enzim kitinase, formulasi kitosan dan karakteristiknya dengan PSA dan FTIR serta uji efektifitas formula (*in vitro* dan *in vivo*) (Gambar 1).



Gambar 1. Flowchart penyiapan formulasi kitosan termodifikasi enzim kitinase dan NaTPP serta karakteristiknya terhadap *C.gloesosporioides*

Perbanyakan Bakteri *B. cepacia* (E-76) dan Jamur *C. gloesosporioides*

Inokulasi bakteri *B. cepacia* E 76 dilakukan pada laminar yang telah disterilkan dengan alkohol. Sebanyak 1 ose bakteri disuspensikan dalam media kaldu nutrisi. Peremajaan jamur dilakukan pada media potato dextrose agar (PDA). Media PDA dilubangi di tengah dengan bor gabus, kemudian diinokulasi *C. gloesosporioides* ke dalam lubang, dan jamur kemudian diinkubasi selama 7-14 hari.

Ekstraksi Kitinase dari *B. cepacia* E76 dan Pengujian Aktivitas Kitinase

Bakteri dikultur pada medium cair Luria Bertani (LB) selama 18 jam menggunakan *hot plate stirrer* (Hitachi). Kemudian 1 mL media LB cair yang mengandung kultur bakteri diinokulasi ke dalam media kitin cair. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar sambil digojok pada 75 rpm menggunakan alat *orbital shaker* (IKA K260). Media kitin cair yang mengandung kultur bakteri disentrifugasi menggunakan alat sentrifugasi (Hitachi D 78532) pada kecepatan 8.400x g selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan, yang merupakan ekstrak kasar enzim, kemudian dicampur dengan amonium sulfat 70% pada volume yang sama sambil diaduk pada suhu 10 °C. Selanjutnya campuran disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4 °C

pada kecepatan 8.400x g dan pelet kemudian dilarutkan dalam PBS pH 6.8. Aktivitas enzim kitinolitik diuji secara kuantitatif dengan mengukur konsentrasi N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) yang terbentuk [15]. Penentuan konsentrasi didasarkan pada standar GlcNAc (Sigma Aldrich), dan sampel diukur menggunakan spektrofotometer (Hitachi U2800) pada $\lambda_{420 \text{ nm}}$.

Pembuatan KBMR, Sintesis Formulasi Partikel Nano Kitosan Metode Gelasi Ionik dan Karakteristiknya

Kitosan (2 g) dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat 1% yang memiliki pH 3,5. Campuran diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 24 jam sehingga kitosan larut, kemudian disaring dan diatur pH ke 5,3 dengan penambahan NaOH. Sebanyak 20 mL larutan kitosan dihidrolisis menggunakan 0,2 mL kitinase pada suhu 37 °C dan waktu inkubasi selama 2 jam. Proses hidrolisis dihentikan dengan memanaskan 100 °C selama 5 menit, kemudian NaOH 2 N ditambahkan dengan volume reaksi yang sama. Kitosan hasil hidrolisis diendapkan menggunakan alat sentrifugasi (Hitachi D78352) pada kecepatan 8.400x g selama 10 menit. Pelet yang merupakan KBMR kemudian dicuci beberapa kali dengan air suling hingga pH netral [9].

Analisis ukuran partikel dan nilai zeta potensial (ZP) dilakukan dengan alat pengukur partikel (PSA) dan Zetasizer (Malvern). Selain itu, partikel kitosan / nano kitosan ditentukan melalui analisis struktural dengan *Fourier-transform infrared spectroscopy* (FTIR). Sampel KBMR berupa sampel partikel gel, dan kitosan dalam bentuk larutan disiapkan dalam bentuk partikel padat granular, kemudian spektrum diukur menggunakan FTIR Spectrophotometer (Shimadzu 8400). Perbedaan sinyal yang dihasilkan dari tiga sampel spektra FTIR kitosan, KBMR, dan partikel nano kitosan kemudian dibandingkan.

Konsentrasi formulasi nano kitosan yang diuji dilakukan mengikuti panduan sebelumnya [8]. KBMR dilarutkan dalam asam asetat 1% menjadi larutan KBMR 0,1%, 0,2% dan 0,3%, kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Kedalam larutan ditambahkan 0,25 mL

larutan Tween 80 0,2% secara perlahan dengan waktu pengadukan selama 30-60 menit. Selanjutnya 0,1% larutan natrium tripolifosfat (NaTPP) ditambahkan ke dalam larutan KBMR sambil diaduk pada suhu kamar untuk proses pengikatan silang yang sempurna. Perbandingan (rasio) volume antara larutan KBMR: NaTPP untuk membentuk suspensi partikel nano yang diuji adalah 5: 1 dan 5: 2 [16].

Pengujian Penghambatan Nano Kitosan Jamur Patogen Secara *In Vitro*

Metode pelat tuang (*pour plate*) digunakan pada uji *in vitro* penghambatan nano kitosan terhadap jamur *C. gloeosporioides*. Media PDA hangat dalam cawan petri dicampur dengan 1 mL formula nano kitosan, kemudian media dibiarkan mengeras. Media PDA dalam cawan Petri yang memiliki diameter 9 cm dilubangi di bagian tengahnya dengan bor gabus. Kemudian isolat *C. gloeosporioides* ditempatkan ke dalam lubang dan diinkubasi selama 6 hari. Perlakuan kontrol disiapkan hanya mengandung PDA dan *C. gloeosporioides* saja. Efektivitas daya hambat patogen ditentukan oleh rumus:

$$DH = (lk - lp) / lk \times 100\%$$

di mana: DH= daya hambat, lk = luas pertumbuhan jamur pada kontrol, lp = luas pertumbuhan jamur pada perlakuan.

Uji *In Vivo* Nano Kitosan terhadap *C. gloeosporioides* pada Mangga Kultivar Manalagi

Mangga kultivar "Manalagi" hasil panen yang ukuran buahnya relatif seragam, dicuci bersih dengan air steril kemudian dikeringkan. Uji *in vivo* dilakukan dengan merendam buah mangga dalam larutan nano kitosan selama 60 menit, dan dikeringkan. Selanjutnya buah tersebut diinokulasi patogen dengan cara dilukai menggunakan jarum steril dan kemudian direndam dalam suspensi konidia *C. gloeosporioides* (10^6 konidia mL⁻¹) selama 30 menit dan dikeringkan. Perlakuan kontrol dilakukan dengan cara yang sama, tetapi nano

kitosan diganti dengan air suling steril. Buah mangga disimpan pada baki steril dan dibungkus dengan plastik bening untuk menjaga kelembaban. Pengujian yang sama diulang sebanyak 2 kali. Pengamatan dilakukan setelah 5-6 hari inokulasi, dan efektivitas penghambatan nano kitosan diukur dengan menghitung tingkat keparahan penyakit.

Tingkat keparahan penyakit antraknosa pada mangga diamati berdasarkan skor keparahan penyakit sebagai berikut: 0 = $0 < x < 1\%$; 1 = $2 < x < 20\%$; 2 = $21 < x < 40\%$; 3 = $41 < x < 60\%$; 4 = $61 < x < 80\%$; dan 5 = $81 < x < 100\%$ [17].

Rumus Tingkat hambat relatif (THR) terhadap penyakit antraknosa dinyatakan sebagai berikut: $THR = (Kpk - Kpp) / Kpk \times 100\%$, di mana: THR= Tingkat hambat relatif, Kpk = tingkat keparahan pada kontrol, Kpp = tingkat keparahan pada perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Kitinase

Pengujian aktivitas enzim kitinase dilakukan untuk menunjukkan aktivitas enzim kitinase yang diekstraksi dari bakteri *B. cepacia* E76 [14]. Aktivitas enzim kitinase ditunjukkan oleh produksi senyawa GlcNAc. Reagen schales (berwarna hijau), berfungsi sebagai indikator yang mengukur konsentrasi GlcNAc secara kuantitatif. Semakin banyak GlcNAc terbentuk, warna yang dihasilkan akan memudar. Pembentukan GlcNAc akan mengurangi intensitas warna hijau. Aktivitas sampel kitinase yang dihasilkan dari tiga ulangan masing-masing sebesar 45,1190; 39,1667; dan 55,2380 ppm, dengan konsentrasi rata-rata sebesar $46,50 \pm 8,12$ (Tabel 1). Data aktivitas enzim kitinase yang diperoleh cukup tinggi, karena *B. cepacia* E76 adalah bakteri kitinolitik yang sebelumnya dilaporkan menghasilkan enzim kitinase dan berfungsi untuk mendegradasi kitosan menjadi KBMR [14; 18].

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
Sampel 1	0,343	45,1190
Sampel 2	0,293	39,1667
Sampel 3	0,428	55,2380
Rata rata \pm Standar deviasi		$46,50 \pm 8,12$

Larutan kitosan direaksikan dengan kitinase yang diekstraksi dengan masa inkubasi 30-60 menit pada suhu 37 °C. Produk dari reaksi depolimerisasi ini adalah kitosan, tetapi bobot molekulnya lebih rendah. Proses ini didasarkan pada proses hidrolisis enzimatis dengan memutus ikatan kitosan 1,4- β -glikosidik [19]. Sebanyak 10 mL kitosan 2% dihidrolisis menggunakan kitinase dari *B. cepacia* E76 dan menghasilkan produk KBMR 0,3706 g dalam bentuk pelet [18]. Kitosan memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan bersifat antijamur, tetapi kitosan ini perlu didegradasi menjadi nano partikel untuk meningkatkan efektivitas sebagai antijamur.

Karakteristik Formulasi KBMR-NaTPP untuk Agen Pelapis Buah Mangga

KBMR selanjutnya dikonversi menjadi partikel kitosan yang lebih kecil dan efektif dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*. Partikel nano kitosan memiliki luas permukaan yang lebih luas yang meningkatkan adsorpsi dan efektifitas sebagai agen antijamur.

Dalam pembuatan nanokitosan perlu ditambahkan larutan kitosan (KBMR) dan sodium tripolifosfat (NaTPP) agar dapat membentuk partikel dan meningkatkan stabilitas partikel. Penggunaan polimer tersebut membutuhkan optimasi untuk mendapatkan formula partikel yang optimal [20]. Perbandingan KBMR dan

NaTPP dibuat bervariasi untuk mengetahui perbandingan yang paling efektif untuk menghasilkan partikel nanokitosan. Formula partikel kitosan dibuat dengan konsentrasi 0,1%; 0,2%; dan 0,3% dengan perbandingan masing-masing KBMR: NaTPP adalah 5: 1, dan 5: 2 (rasio volume kecil).

Partikel nano kitosan terbentuk secara spontan karena pengadukan mekanis pada suhu kamar. Mekanisme pembentukan kitosan nano berdasarkan interaksi elektrostatik antara gugus amina kitosan (-NH₂) dan muatan negatif pada polianion seperti tripolifosfat (TPP). Kompleksitas interaksi antar muatan yang berbeda ini menghasilkan kitosan yang mengalami gelasi ionik dan diendapkan untuk membentuk partikel [21].

Analisis FTIR dan Ukuran Partikel Nano Kitosan

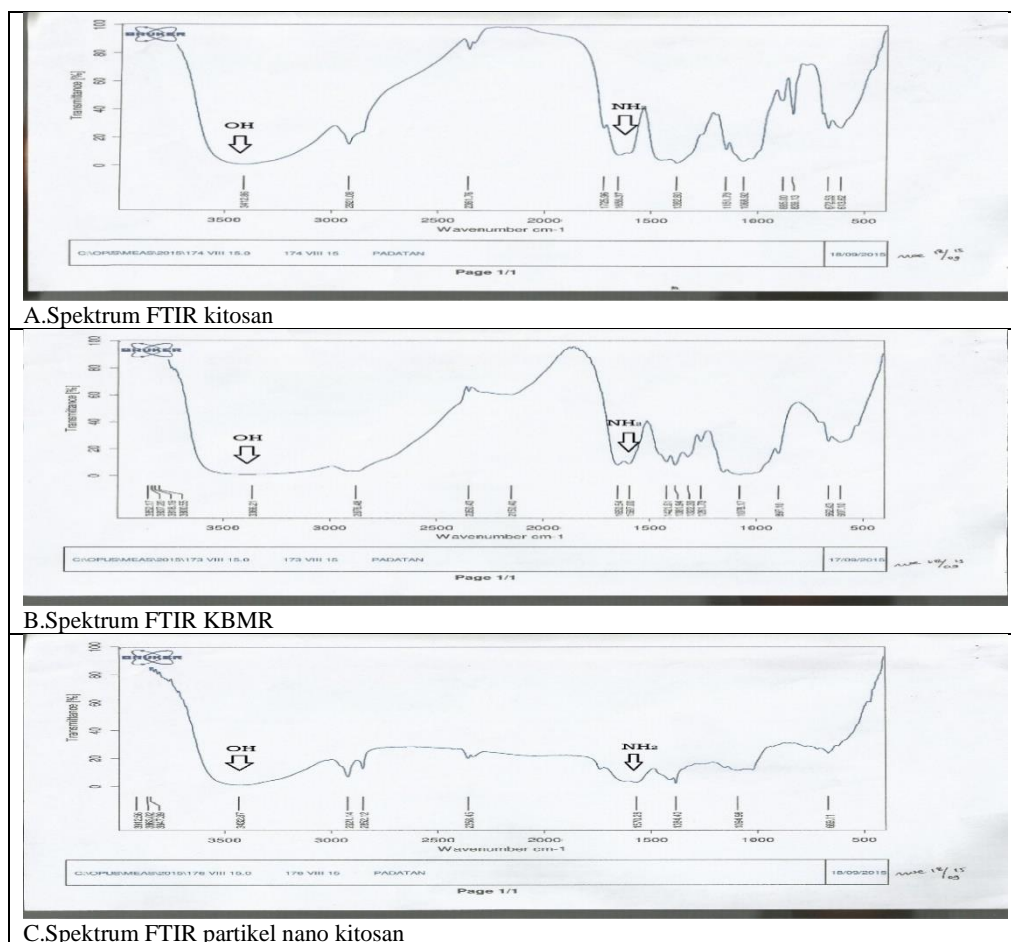
Karakterisasi FTIR dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui perbedaan sinyal yang dihasilkan oleh partikel kitosan, KBMR, dan nano kitosan (Gambar 2). Spektrum warna partikel nano kitosan menunjukkan beberapa puncak khas yang menunjukkan karakteristik struktur kitosan misalnya pada puncak bilangan gelombang 3400cm⁻¹ yang menunjukkan gugus alkohol, gugus amina 1600cm⁻¹ dan gugus karbonil 1740cm⁻¹.

Tabel 2. Data analisis FTIR pada kitosan, KBMR, dan nano kitosan

Jenis Vibrasi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		
	Kitosan	KBMR	Partikel nano kitosan (KBMR: NaTPP)
OH	3412,86	3366,21	3432,87
R-NH ₂	1656,37	1597	1570,8
CH(-CH ₂)	2921,08	2876,48	2852,12
C=O	1725,96	1650,54	-
CH	1382,8	1421,51	1384,4
C-O	1068,92	1078,17	1094,98

Secara umum, spektrum inframerah dapat mengidentifikasi konten kelompok fungsional dalam senyawa. Gugus fungsional khas yang ada dalam partikel kitosan murni adalah gugus hidroksil (-OH) dan gugus amida (-NH₂) [23].

Gugus fungsi hidroksil dalam kitosan muncul pada bilangan gelombang 3450-3200 cm⁻¹, sedangkan gugus fungsi amida muncul pada bilangan gelombang 1660-1500 cm⁻¹.



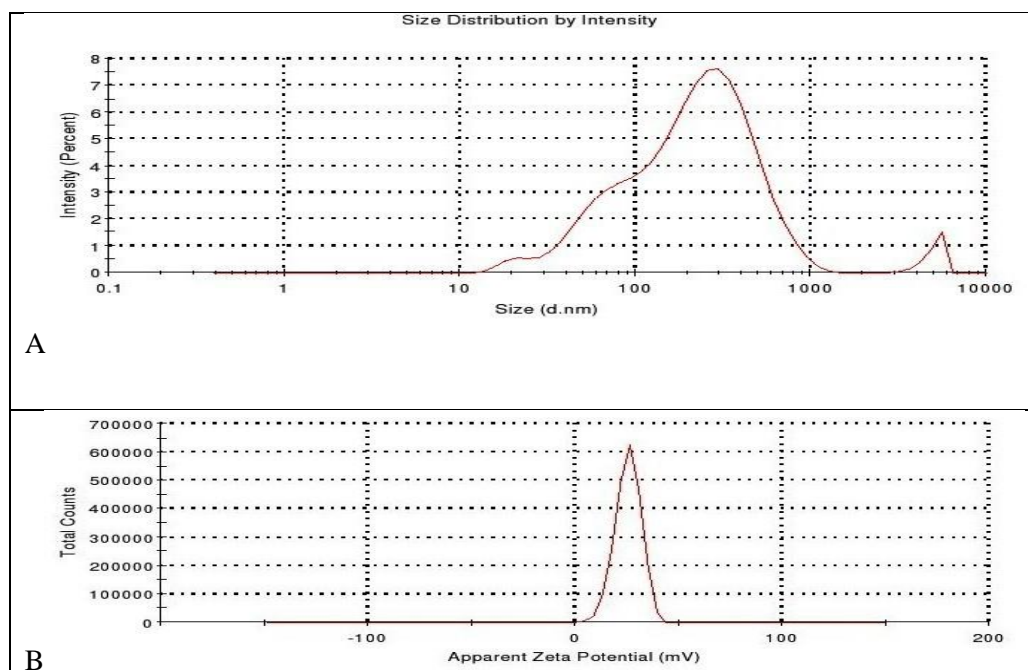
Gambar 2. Spektra FTIR pada kitosan (A), KBRM (B) dan nano kitosan (C)

Berdasarkan Tabel 2, pada partikel kitosan tidak ada gugus fungsional karbonil ($C = O$) dan perubahan jumlah gelombang dari tiga sampel. Ini menunjukkan interaksi antara gugus fungsi karena penambahan TPP dan proses deasetilasi kitosan menjadi partikel nano kitosan. Proses degradasi kitosan ditandai dengan pergeseran jumlah gelombang dan hilangnya gugus karbonil (Gambar. 2).

Penentuan ukuran partikel nano dalam penelitian ini menggunakan analisis *Particle Size Analyzer* (PSA) (Gambar 3). Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam kondisi penyiapan konsentrasi kitosan 0,3%, NaTPP 0,1% (5: 1), partikel nano kitosan membentuk ukuran 126,2 nm dengan nilai ZP sebesar $25,5 \pm 6,1$ mV (Gambar 3). Hasil analisis PSA menunjukkan bahwa partikel kitosan yang disiapkan pada rasio volume 5: 1 umumnya menunjukkan pola distribusi puncak. Pada rasio volume besar 5:2, partikel-partikel yang terbentuk dari reaksi elektrostatis antara kitosan dan Na TPP sangat

banyak dan padat, dan dikelompokkan untuk membentuk agregat menjadi partikel > 200 nm.

Ukuran rata-rata formulasi partikel kitosan meningkat dengan rasio volume KBRM dan NaTPP [22]. Dalam penelitian ini, rasio KBRM dan volume NaTPP 5: 1 menghasilkan rata-rata ukuran partikel terkecil 126,2 nm dengan nilai indeks polidispersitas (IP) 0,447, dan nilai zeta potensial (ZP) $25,5 \pm 6,1$ mV. Nilai IP masih jauh di bawah nilai 1 sehingga dapat diartikan tingkat keseragamannya cukup baik. Partikel nano yang disiapkan pada rasio 5: 1 menunjukkan bahwa partikel nano yang terbentuk memiliki kisaran distribusi ukuran pendek atau dengan kata lain tingkat keseragaman yang baik. Nilai ZP sebesar $25,5 \pm 6,1$ mV sangat relevan dan memperkuat pola distribusi data dengan nilai IP. Partikel nano pada ukuran sangat kecil dan IP rendah menunjukkan potensi nilai tinggi (hampir 30 mV) yang berarti cukup stabil. Berdasarkan analisis semakin kecil rasio volume KBRM terhadap NaTPP dan waktu pengadukan, maka ukuran partikel yang diperoleh semakin kecil.



Gambar.3. Karakteristik formula nano kitosan dengan analisis PSA (A), dan Zeta Potensial (B)

Uji Penghambatan *C. gloeosporioides* In Vitro

Hasil uji *in vitro* menunjukkan bahwa nano kitosan mampu menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Secara umum, hasil rata-rata pengukuran koloni *C. gloeosporioides* dalam uji *in*

vitro menunjukkan perbedaan daerah koloni antara perlakuan kontrol dan formula nano kitosan. Perlakuan *in vitro* nano kitosan mampu menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* dengan daya hambat berkisar antara 61,28% - 93,75% (Tabel 3).

Tabel 3. Daya hambat formula nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro*

Perlakuan Rasio	Luas koloni pertumbuhan <i>C. gloeosporioides</i> (cm ²)	Tingkat hambat relatif (THR) (%)
Kontrol (tanpa aplikasi)	63,58	-
KBMR 0.1 % : NaTPP 0.1 % (5:1)	8,94	85,94
KBMR 0.1 % : NaTPP 0.1 % (5:2)	15,89	75,0
KBMR 0.2 % : NaTPP 0.1 % (5:1)	11,3	82,2
KBMR 0.2 % : NaTPP 0.1 % (5:2)	24,62	61,28
KBMR 0.3 % : NaTPP 0.1 % (5:1)	15,89	75,0
KBMR 0.3 % : NaTPP 0.1 % (5:2)	3,97	93,75

Keterangan: $THR = \frac{Lk \text{ kontrol} - Lk \text{ perlakuan}}{Lk \text{ kontrol}} \times 100\%$

Kitosan mampu menginduksi respon resistensi tanaman terhadap infeksi patogen [24]. Kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* diduga disebabkan oleh aktivitas kitinase, glukonase, dan senyawa antijamur lainnya dalam nano kitosan [25].

Uji In Vivo Nano Kitosan terhadap *C. gloeosporioides* pada Mangga Kultivar Manalagi

Perlakuan *in vivo* nano kitosan terhadap penghambatan *C. gloeosporioides* pada buah mangga kultivar Manalagi menunjukkan tingkat keparahan penyakit yang berbeda antara

perlakuan, berkisar antara 20,5 hingga 80,5% (Tabel 4).

Tabel 4. Daya hambat formula nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* pada mangga kultivar Manalagi secara *in vivo*

Perlakuan Rasio	Rerata keparahan penyakit (%)	Tingkat hambat relatif (THR) %
Kontrol (tanpa aplikasi)	80,5 ^a	-
KBMR 0.1 % : NaTPP 0.1 % (5:1)	40,5 ^{bc}	49,7
KBMR 0.1 % : NaTPP 0.1 % (5:2)	50,5 ^b	37,3
KBMR 0.2 % : NaTPP 0.1 % (5:1)	50,5 ^b	37,3
KBMR 0.2 % : NaTPP 0.1 % (5:2)	50,5 ^b	37,3
KBMR 0.3 % : NaTPP 0.1 % (5:1)	50,5 ^b	37,3
KBMR 0.3 % : NaTPP 0.1 % (5:2)	20,5 ^c	74,5

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada $P=0.05$.

$$\text{THR} = \frac{Kp \text{ kontrol} - Kp \text{ perlakuan}}{Kp \text{ kontrol}} \times 100\%$$

Tingkat keparahan penyakit yang disebabkan oleh *C. gloeosporioides* pada perlakuan kontrol lebih besar daripada perlakuan partikel kitosan (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa variabel konsentrasi sangat berpengaruh terhadap efektivitas daya hambat penyakit antraknosa sehingga perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk menemukan formula nano kitosan yang optimal untuk aplikasi selanjutnya.

Tingkat keparahan penyakit antraknosa dalam perlakuan antijamur pada mangga kultivar Manalagi berkisar antara 20,5 hingga 50,5%. Mangga yang diperlakukan dengan nano kitosan masih menunjukkan pertumbuhan *C. gloeosporioides*, tetapi tidak separah perlakuan kontrol. Kitosan mampu menghambat laju respirasi dan kandungan etilen buah, memperpanjang usia simpan buah, menginduksi lignifikasi dan pembentukan kalosa dalam epidermis kulit buah, dan menginduksi peningkatan kadar senyawa fenol total dan total kandungan protein kasar buah [6].

Persentase daya hambat jamur paling baik ditunjukkan partikel kitosan pada konsentrasi KBMR 0,3% dan NaTPP 0,1% (rasio 5: 2) dengan rerata tingkat keparahan penyakit 20,5%. Partikel-partikel kitosan pada rasio 5: 2 memiliki kekuatan penekanan patogen dengan penghambatan sebesar 74,5% (Tabel 4). Hasil penelitian lain melaporkan bahwa tingkat penghambatan kitosan pada konsentrasi 20-150 mg terhadap jamur patogen *Phomopsis asparagi* adalah sebesar 80%, dan 90% masing-masing terhadap *Fusarium oxysporum*, *Cucumernum owen*, *Rhizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum* [26].

Berdasarkan data yang diperoleh, partikel kitosan yang digunakan sebagai pelapis (*coating*) buah merupakan agen penghambat pertumbuhan yang sangat baik untuk jamur *C. gloeosporioides* karena ramah lingkungan dan mudah terurai secara hayati. Kitosan asal kulit udang atau kepiting mempunyai bobot molekul (BM) rendah sebesar 2000 g/mol [27]. Kitosan mampu menghambat pertumbuhan *C. musae* melalui penghambatan perkecambahan konidium, mengurangi lebar hifa, dan menyebabkan lisis hifa [28], sehingga kitosan memiliki potensi untuk mengendalikan penyakit antraknosa.

Kitosan mampu menghambat laju respirasi dan tingkat etilen buah, memperpanjang umur simpan buah, dan menginduksi peningkatan kadar total senyawa fenol dan total kandungan protein kasar buah [28]. Mekanisme penghambatan nano kitosan adalah interaksi dengan membran sel, dimana kitosan polikation dapat berikatan dengan muatan negatif dari membran sel melalui interaksi elektrostatis, sehingga mempengaruhi permeabilitas membran sel dan mengakibatkan kebocoran bahan intraseluler seperti enzim, protein, bahan genetik lainnya. Selain itu, inaktivasi enzim sangat penting, kitosan berikatan dengan DNA dan menghambat mRNA dalam sintesis protein. Nano kitosan mampu menghancurkan bahan genetik mikroba, dimana kitosan sebagai pengkelat logam mampu mengikat ion logam kedalam larutan intraseluler yang memainkan peran penting untuk kelangsungan hidup sel mikroba [29].

Penghambatan pertumbuhan *C. gloeosporioides* oleh kitosan diduga terjadi karena kandungan sifat antijamur dari spektrum luas gugus amino dalam bentuk asetil amino (HCOCH_3) dan glukosamin ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NH}_2$). Gugus amino dapat mengikat bagian makromolekul bermuatan negatif dari polikationik alami pada permukaan sel jamur, sehingga pertumbuhan jamur akan terhambat [27]. Selama penelitian, kondisi lingkungan sangat sesuai untuk terjadinya infeksi *C. gloeosporioides*, sebagaimana dilaporkan bila interaksi inang-patogen kompatibel pada permukaan buah, akan mengakibatkan hilangnya pertahanan mekanis buah [6;7].

Dari hasil penelitian ini masih diperlukan analisis lain seperti uji viskositas untuk menentukan bobot molekul (BM) kitosan, dan uji scanning elektron mikroskopi (SEM) untuk mengamati kerusakan dinding sel jamur oleh partikel nano kitosan. Selain penerapan formulasi partikel nano kitosan yang lebih efektif, maka penambahan variabel lain seperti metabolit sekunder sebagai antifungi juga perlu dipelajari lebih lanjut.

KESIMPULAN

- Hasil penelitian menunjukkan bahwa partikel nano kitosan (KBMR 0,3%, NaTPP 0,1% rasio 5:1) mempunyai ukuran 126,2 nm dan nilai ZP $25,5 \pm 6,1$ mV.
- Pengamatan *in vitro* formula nano kitosan dapat menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* pada kisaran penghambatan 61,28 – 93,75%.
- Formula nano kitosan terbaik untuk menekan *C. gloeosporioides* secara *in vivo* pada buah mangga kultivar Manalagi adalah pada rasio volume KBMR (0,3%): NaTPP (0,1%) 5: 2 dengan tingkat hambat relatif sebesar 74,5%.
- Untuk kajian selanjutnya, perlu diuji penambahan variabel lain diantaranya optimasi formula partikel nano kitosan agar diperoleh ukuran dan stabilitas partikel yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai APBN 2015 (RPTP Dr. I Made Samudra). Penghargaan disampaikan kepada Sdr. Mitha Ekaputri serta tim teknis Lab. Mikrobiologi yang telah membantu kelancaran penelitian.

REFERENSI

- [1] Rebin, Karsinah, dan A. Soemargono, 2013, Peningkatan produktivitas dan kualitas mangga komersial Indonesia melalui pemuliaan dan pengelolaan tanaman. <http://www.mada.gov.my/documents/10124/b71dcdba-2310-497d-a7a3-ddd65049b757>.
- [2] Semangun, H. 2000, Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia. Edisi ke-4. Yogyakarta (ID): UGM Press.
- [3] Pracaya. 2008, Bertanam Mangga. Depok (ID): PT Penebar Swadaya.
- [4] Koul, O, S. Walia, and G.S. Dhaliwal. 2008, Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopest. Int* Vol. 4, No. 1, p. 63-84]
- [5] Abd-Elsalam, K.A., and M.A., Alghuthaymi. 2015, Nanobiofungicides: are they the next-generation of fungicides?. *J. Nanotechnol. and Material Sci.* Vol. 2, No.1, p.1-3
- [6] Bautista-Banos S., A.N.H, Lauzardo., M.H.L Vallea, M.H. Lopez, E.A. Barkab, E.B. Molinac, and C.L. Wilson. 2006, Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* Vol.25, p.108-118.
- [7] Gonzalez-Aguilar G.A., J.J. Cellis., R.R. Sotelo-Mundo., L.A. De La Rosa., G.J.Rodrigo, and P.E. Alvarez. 2008, Physiological and biochemical changes of different fresh-cut mango cultivars stored at 5°C. *Int J Food Sci Technol.* Vol. 43, p. 91-101.
- [8] Agnihotri S.A., N. Nadagounda, Mallikarjuna, M. Tejjraj, and Aminabhavi. 2004, Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *J. Control Release* Vol. 100, p.5-28.
- [9] Kumar A.B.V., M.C. Varadaraj, L.R. Gowda, and R.N. Tharanathan. 2007, Low molecular weight chitosan-preparation with the aid of

- pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1770, p. 495-505.
- [10] Tiyafoonchai, W. 2003, Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal* Vol. 11, No. 3, p. 51–66.
- [11] Sing R, and J.W. Lillard. 2009, Review nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*. Vol. 86, p. 215-223.
- [12] Hernandez-Lauzardo A.N., M.G. Velazquez-del Vale. L.Veranza-Castelan.,G.E.Melo-Giorgana, and M.G. Guerra-Schancez. 2010, Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained from peach, papaya, and tomato. *J Fruits*. Vol. 65, p. 245-253.
- [13] Rismana E., S. Kusumaningrum, I. Rosidah, Nizar, and E. Yulianti. 2013, Pengujian stabilitas sediaan antiacne berbahan baku aktif nanopartikel kitosan/ekstrak manggis-pegagan. *Balai Penelitian Kesehatan*. Vol. 41, No. 4, p. 207-216.
- [14] Suryadi Y, T.P. Priyatno, I M. Samudra, Dwi N. Susilowati,T.S. Sriharyani, and Syaefudin. 2017, Control of anthracnose disease [*Colletotrichum gloeosporioides*] using nano chitosan hydrolyzed by chitinase derived from *Burkholderia cepacia* Isolate E76. *Jurnal AgroBiogen*. vol.13, No.2, p. 111–122
- [15] Toharisman A, M.T. Suhartono, Spindler-Barth, Hwang, and Y.R. Pyun. 2005, Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World J. Microbiol, Biotechnol* Vol. 21, p. 733-738.
- [16] Chattopadhyay D.P, and M.S. Inamdar. 2012, Studies on synthesis. characterization. and viscosity behaviour of nano chitosan. *Research Journal Of Engineering Sciences*. Vol. 1, No. 4, p. 9-15.
- [17] James. W.C. 1971, An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Can. Plant Dis. Surv.* June, Vol. 51, No.2, p. 1-65.
- [18] Suryadi, Y., Priyatno, T.P., Samudra, I.M., Susilowati, D.N.,Nurzulaika, H. and Syaefudin. 2016,Waktu inkubasi pada derajat distilasi kitosan enzim dan efektivitas penghambatannya terhadap penyakit antraknosa. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, vol.12, No. 6, p. 209–217.
- [19] Li J, Y. Du, J. Yang, P. Feng, A. Li, and P. Cheng. 2005, Preparation and characterization of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 87, p. 441-448.
- [20] Guaix M., C. Carbonell. J.Comenge, Garcia Fernandez, A. Alarcon and Casals. 2008, Nanoparticles for cosmetics. *Contribution to science*. Vol. 4, No. 2, p.213-217.
- [21] Xu Y, and Du Y. 2003, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharmaceutics* Vol. 250, No. 1, p. 215-226.
- [22] Mardliyati E, S.E. Muttaqien, D.R. Setyawati, I. Rosidah, and Sriningsih. 2012, Preparasi dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantar insulin secara oral. Di dalam: Mardliyati E, Muttaqien SE, Setyawati D.R., Rosidah I, Sriningsih, (eds). *Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan*; 2012 Okt 3; Serpong, Indonesia.Prosiding InSiNas. hlm 90-93.
- [23] Firdaus F. Darmawan E, dan S. Mulyaningsih 2008, Karakteristik spectra infrared (IR) kulit udang, kitin, dan kitosan yang dipengaruhi oleh proses demineralisasi, deproteinisasi, deasetilasi I, dan deasetilasi II. *Jurnal Ilmiah Farmasi* Vol. 4, p.11-22.

- [24] Hadrami E.A, L.R. Adam, E.I. Hadrami, and F. Daayf. 2010, Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*. Vol. 8, No. 4, p. 968-987.
- [25] Vasyukova N.I, S.V. Zinoveva, L.I. Iiinskaya, E.A. Perekhod, G.I. Chalenko, N.G. Gerasimova, A.V. Iina, V.P. Varlamov, and O.L. Zeretskivskaya. 2001, Modulation of plant resistance to diseases by water soluble chitosan and polyphenols. *Food Sci Tech Int*. Vol. 13, No. 4, p. 317-322.
- [26] Goy, R.C, D. Brino, and O.B.G. Assis. 2009, A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Ciência e Tecnologia*. Vol. 19, No. 3, p. 241-247.
- [27] Restuati M. 2008, Perbandingan kitosan kulit udang dan kulit kepiting dalam menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus*. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi*; 2008 Nov 17; Bandar Lampung. Bandar Lampung (ID): Satek. Hlm. 582-590.
- [28] Pamekas T. 2009, Induksi Ketahanan Buah Pisang Ambon Curup terhadap Penyakit Pascapanen Antraknos dan Penundaan Kematangan dengan Aplikasi Kitosan. Yogyakarta (ID): Fakultas Pertanian UGM.
- [29] Vellingiri, K., T. Ramachandran, and M. Senthilkumar. 2013, Eco-friendly application of nano chitosan in antimicrobial coatings in the textile industry. *Nanosci. and Nanotechnol*. Vol. 3, No. 4, p.75-89.