

## Aktifitas Antifungi Kitosan Hasil Hidrolisis Enzimatis Terhadap Penyakit Antraknosa

Yadi Suryadi<sup>\*1</sup>, Dwiningsih Susilowati<sup>2</sup>, dan I Made Samudra<sup>3</sup>  
\*e-mail penulis koresponden: yshid@yahoo.co.uk

<sup>1,2,3</sup> Lab. Mikrobiologi dan Biokimia, BB Biogen, Jl Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

### ABSTRACT

Anthrax disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* is one of an important fungal pathogen on mango fruits during the pre harvest or post harvest stage. The use of chitosan as an alternative method to control the disease is necessary due to its biodegradable, biocompatible and non-toxic effect. Chitosan tripolyphosphate (C-TPP) showed higher inhibition to *C. gloeosporioides* compared with that of low molecular weight (LMW) chitosan as affected by its particle size. The best of disease inhibitory activity was revealed by C-TPP B [0.2% LMW : 0.1% TPP; (5: 2)] and C [0.2% LMW: 0:08% TPP; (5: 1)] treatments based on *in vitro* and *in vivo* test. Because of the concentration of chitosan and TPP may affect to particle structure, hence the C-TPP formation needs further to be optimized so that the size is getting smaller and stable.

**Keywords:** anthracnose, chitosan, *C.gloeosporioides*, chitinase

### ABSTRAK

Penyakit antraknosa yang disebabkan oleh *Colletotrichum gloeosporioides* adalah salah satu fungi patogen penting pada buah mangga selama tahap pra panen atau pasca panen. Penggunaan kitosan sebagai metode alternatif untuk mengendalikan penyakit diperlukan karena efeknya yang dapat terbiodegradasi, biokompatibel, dan tidak beracun. Kitosan tripolifosfat (K-TPP) menunjukkan penghambatan lebih tinggi terhadap *C. gloeosporioides* dibandingkan dengan kitosan dengan berat molekul rendah (BMR) karena dipengaruhi oleh ukuran partikelnya. Aktivitas penghambatan penyakit terbaik ditunjukkan oleh perlakuan K-TPP B [0,2% LMW: 0,1% TPP; (5: 2)] dan C [0,2% LMW: 0: 08% TPP; (5: 1)] berdasarkan uji *in vitro* dan *in vivo*. Karena konsentrasi kitosan dan TPP sangat berpengaruh terhadap struktur partikel, maka pembentukan K-TPP perlu dioptimalkan lebih lanjut sehingga ukurannya semakin kecil dan stabil.

**Kata kunci:** antraknosa, kitosan, *C. gloeosporioides*, kitinase

### PENDAHULUAN

Salah satu kendala yang dihadapi oleh eksportir buah mangga adalah buah banyak mengalami kerusakan di penyimpanan. Buah mangga hanya dapat bertahan hingga 7 hari pada suhu ruangan, selebihnya mangga akan mengalami kerusakan selama proses pematangan fisiologis buah. Kerusakan

buah mangga akibat fungi penyebab penyakit yang paling utama diantaranya adalah serangan antraknosa yang disebabkan fungi *Colletotrichum gloeosporioides* (Hu *et al.*, 2014).

Pengendalian antraknosa pada buah pascapanen biasa dilakukan dengan pemberian fungisida sintetik seperti

copper hydroxide, mancozeb, copper sulfate, prokloraz dan azoxystrobin (strobilurinbenomil) atau dikombinasikan dengan perlakuan-perlakuan lainnya (Sharma & Kulshrestha, 2018). Namun, fungisida tersebut selain bersifat toksik dan mencemari lingkungan, juga bersifat resisten terhadap patogen dan membahayakan kesehatan manusia, oleh karena itu diperlukan alternatif pengendalian yang lebih aman.

Kitosan merupakan salah satu alternatif pengendalian antraknosa yang aman bagi manusia untuk karena bersifat biodegradabel, biokompatibel, dan non-toksik (Ing *et al.*, 2012). Kitosan [(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukan] merupakan polisakarida berasal dari limbah kulit/cangkang *Crustaceae*. Senyawa ini merupakan biopolimer alami yang bersifat polikationik sebagai hasil dari deasetilasi kitin (Ali *et al.*, 2013). Karena sifat polikationik tersebut kitosan dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri dan antifungi. Kitosan antara lain memiliki aktifitas antifungi terhadap *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* (Zhong *et al.*, 2007) dan *Rhizopus stolonifer* (Lauzardo *et al.*, 2009). Aktivitas kitosan terhadap fungi *C. gloeosporioides* setelah diteliti secara *in vivo* terhadap buah naga (Ali *et al.*, 2013) dan pepaya (Hewajulige *et al.*, 2009) dan terbukti dapat menghambat pertumbuhan fungi tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antifungi kitosan dipengaruhi oleh bobot molekul (BM), derajat substitusi, konsentrasi, jenis fungi, dan tipe gugus fungsi pada rantai turunannya. Kitosan dapat dipreparasi menjadi kitosan bobot molekul rendah (K-BMR) hingga berukuran nanopartikel. Semakin kecil ukurannya maka aktivitas kitosan akan mengalami kenaikan (Ali *et al.*, 2013). Preparasi K-BMR dapat dilakukan dengan bantuan enzim hasil metabolit sekunder bakteri *Bacillus firmus* (E-65). Isolat tersebut diketahui memiliki aktivitas kitinase yang tinggi

dalam mendegradasi kitin (Suryadi *et al.*, 2013) sehingga dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi kitosan menjadi K-BMR (Mulyaningtyas *et al.*, 2016). Degradasi molekul secara enzimatik mempunyai beberapa kelebihan, yaitu lebih ramah lingkungan, lebih spesifik terhadap substrat tertentu, dan K-BMR yang dihasilkan lebih baik strukturnya.

Molekul dengan ukuran partikel mikro dan atau nano akan terbentuk secara spontan apabila ke dalam larutan kitosan dengan konsentrasi tertentu ditambahkan dengan larutan polianion seperti tripolifosfat yang disertai dengan pengadukan terus menerus. Ukuran partikel kitosan yang terbentuk ditentukan antara lain oleh perbandingan konsentrasi kitosan dengan TPP (Ing *et al.*, 2012).

Penelitian ini bertujuan mendapatkan kondisi optimum preparasi partikel kitosan dengan karakteristik terbaik untuk mengendalikan penyakit antraknosa pada mangga melalui pengujian *in vivo* dan *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Preparasi bakteri dan pengujian aktivitas kitinase secara kuantitatif

Isolat bakteri *Bacillus firmus* E65 (BiogenCC) dibiakkan pada media Luria Bertani (LB) cair selama 18 jam. Kemudian 1 mL media LB cair yang berisi biakan bakteri diinokulasikan ke dalam media kitin cair. Biakan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruangan sambil digoyang dengan putaran 75 rpm menggunakan *orbital shaker* (IKA K-260). Media kitin cair yang berisi biakan bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm (Hettich D-78532) selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan merupakan ekstrak kasar enzim. Presipitasi enzim dilakukan dengan mencampurkan amonium sulfat 70% ke dalam supernatan dengan volume yang sama sambil diaduk pada suhu >10°C.

Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi lagi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet enzim kemudian dilarutkan dalam PBS pH 6.8 dalam jumlah yang minimal. Enzim tersebut selanjutnya disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan.

Aktivitas kitinase dari enzim kitinolitik asal *Bacillus firmus* E65 diuji secara kuantitatif dengan mengukur konsentrasi N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) yang terbentuk mengacu prosedur (Toharisman *et al.*, 2015). Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dengan mencampurkan 450 µL enzim, 450 µL PBS pH 7, dan 900 µL koloid kitin kemudian dikocok dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit pada inkubator (Memmert INE500). Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 5 000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang telah diperoleh diambil sebanyak 500 µL kemudian ditambahkan dengan 500 µL akuades dan 1 mL pereaksi Schales, campuran dididihkan pada 100°C selama 10 menit. Setelah didinginkan, sampel diukur dengan spektrofotometer (Hitachi) pada absorbansi  $\lambda_{420 \text{ nm}}$ .

### **Pembuatan K-BMR, dan preparasi kitosan tripolifosfat (K-TPP) metode gelasi ionik**

Pembuatan K-BMR mengacu pada penelitian (Kumar *et al.*, 2007). Masing-masing sebanyak 2 g, 0.25 g, 0.5 g, 1.0 g, dan 1.25 g kitosan (derajat deasetilasi 93.8%), dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat 1%, pH 3.5. Campuran tersebut diaduk selama 24 jam menggunakan pengaduk magnetik agar kitosan larut. Larutan kitosan yang telah larut disaring dan diatur pH-nya menjadi 5.3 dengan ditambahkan NaOH. Larutan kitosan sebanyak 20 mL dihidrolisis menggunakan 0.2 mL kitinase pada suhu 37°C serta waktu inkubasi selama 2 jam. Proses hidrolisis dihentikan dengan

pemanasan 100°C selama 5 menit. Hidrolisat selanjutnya dipresipitasi dengan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit, peletnya dicuci beberapa kali dengan air destilasi hingga pH netral. Pelet tersebut merupakan K-BMR. Pelet hasil presipitasi disimpan dalam lemari pendingin sampai dilakukan pengujian selanjutnya.

K-TPP dipreparasi dengan memodifikasi metode (Mardiyati *et al.*, 2012). K-BMR dilarutkan dalam asam asetat 1% sehingga konsentrasinya menjadi 0.1% dan 0.2%, kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnet pada kecepatan sedang. Larutan ditambahkan 0.25 mL tween 80 0.2% setes demi setetes dengan tetap diaduk selama 30 menit. Sementara itu, larutan TPP 0.1 % dan 0.08 % dibuat dengan melarutkan TPP ke dalam air deionisasi. Larutan TPP pada berbagai variasi rasio volume ditambahkan setetes demi setetes sambil tetap diaduk pada suhu ruang. Perbandingan volume (v/v) antara larutan K-BMR:TPP adalah (5:1) dan (5:2). Pengadukan terus dilanjutkan sampai satu jam agar proses ikat silang antara NaTPP dan K-BMR berlangsung sempurna. Suspensi partikel yang terbentuk kemudian disimpan dalam lemari es hingga dilakukan pengujian.

### **Analisis struktur K-BMR dan K-TPP**

Sebanyak 2 mg serbuk contoh dicampur dengan 100 mg KBr untuk dijadikan pelet. Pelet dibuat menggunakan *handPress* Shimadzu dengan tekanan 8 psi selama 15 menit. Spektrum diukur dengan spektrofotometer FTIR pada kisaran bilangan gelombang 4000 sampai 400  $\text{cm}^{-1}$  (FTIR Tensor 37, Bruker). Ukuran partikel K-TPP diukur menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*) (Zetasizer Malvern, UK).

### **Pengujian daya hambat terhadap fungsi secara *in vitro* dan *in vivo***

Metode tuang secara *in vitro* yang digunakan pada uji daya hambat nanokitosan terhadap fungi merupakan modifikasi metode (Palma-Guerrero *et al.*, 2008). Sebanyak 1 mL larutan kitosan pada berbagai variasi rasio ditambahkan ke media PDA yang masih hangat dalam cawan petri, kemudian dibiarkan mengeras. Media PDA dalam cawan petri berdiameter 9 cm, pada bagian tengahnya dilubangi dengan alat *cork borer*. Kemudian isolat *C. gloesporioides* diletakan ke lubang tersebut dan diinkubasi selama 4 hari. Perlakuan kontrol hanya berisi PDA dan *C. gloesporioides*.

Metode pengujian *in vivo* dilakukan dengan memodifikasi metode (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2008). Buah yang digunakan adalah mangga jenis Indramayu dengan ukuran yang seragam, kemudian dicuci bersih dengan air steril dan dikeringanginkan. Buah mangga kemudian direndam dalam larutan K-TPP dan dikeringanginkan. Selanjutnya buah ditusuk-tusuk dengan jarum steril dan diimersi dengan suspensi konidia *C. gloesporioides* ( $10^7$  konidia/mL) dan dikeringanginkan. Perlakuan kontrol dilakukan dengan cara sama tetapi nanokitosan diganti akuades steril. Semua perlakuan dilakukan duplo. Buah disimpan di atas baki steril dan ditutup dengan plastik bening untuk menjaga kelembapan. Pengamatan keparahan penyakit pada perlakuan buah mangga dilakukan setelah 4 hari. Skor keparahan penyakit antraknosa dinilai berdasarkan skala 0 – 5 sebagai berikut: skor 0 =  $0 \leq x < 1$  %; 1 =  $1 \leq x \leq 20$  %; 2 =  $21 \leq x \leq 40$  %; 3 =  $41 \leq x \leq 60$  %; 4 =  $61 \leq x \leq 80$  %; dan 5 =  $81 \leq x \leq 100$  % buah tertutupi oleh patogen.

Daya hambat (DH) terhadap patogen fungi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$DH = \frac{(I_k - I_p)}{I_k} \times 100 \%$$

dimana  $I_k$ =intensitas penyakit pada kontrol;  $I_s$ = intensitas penyakit pada perlakuan (Suryadi *et al.*, 2017).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Aktivitas kitinase secara kuantitatif

Hasil pengukuran aktivitas enzim asal bakteri isolat E65 menunjukkan konsentrasi NAcGlc sebesar  $24.331 \pm 1.840$  (mg/mL). Perolehan aktivitas enzim ini sudah cukup untuk digunakan dalam menghidrolisis kitosan lebih lanjut menjadi kitosan dengan BM lebih rendah.

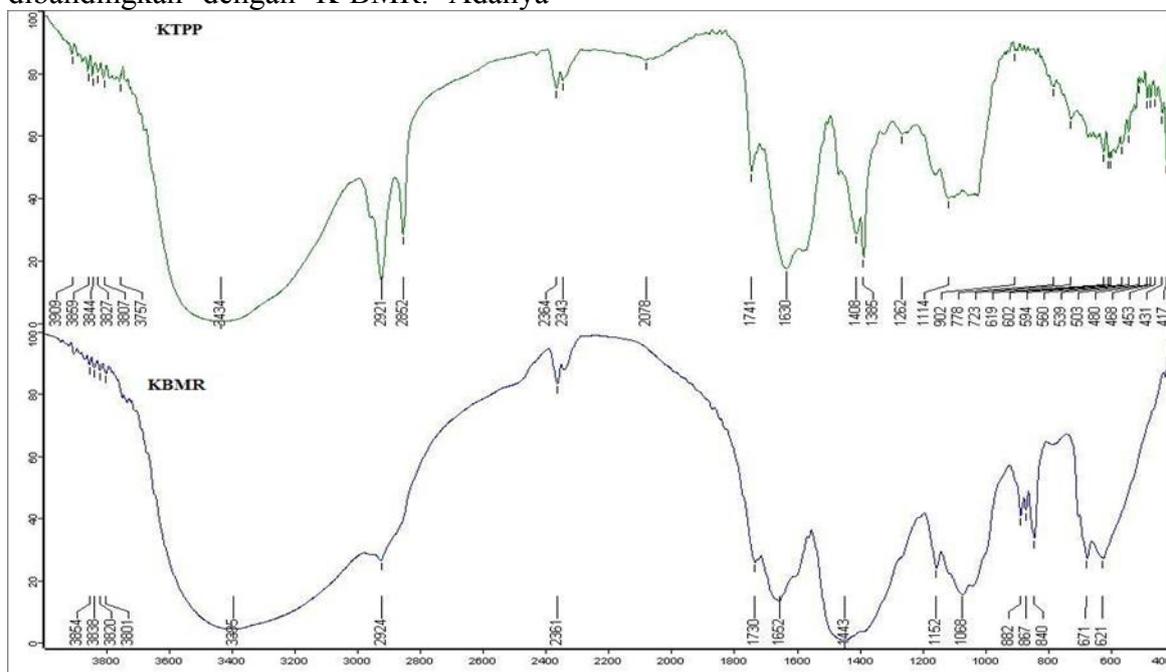
### Analisis Struktur K-BMR dan K-TPP

Analisis FTIR dilakukan untuk menganalisa gugus fungsi yang ada pada K-BMR dan K-TPP. Spektrum FTIR dari K-BMR memiliki pita serapan yang khas dari gugus hidroksil, eter, dan amina primer yang terdapat pada strukturnya (Brugnerotto *et al.*, 2001). Gambar 1 menunjukkan puncak-puncak spesifik pada K-BMR. Pada bilangan gelombang  $3395 \text{ cm}^{-1}$  terdapat pita serapan dari gugus OH dan pada  $2924 \text{ cm}^{-1}$  terdapat pita serapan dari CH alifatik. Pita serapan dari N-H tekuk pada amina primer ditunjukkan pada  $1652 \text{ cm}^{-1}$ , selanjutnya pita serapan C-H tekuk terdapat pada  $1443 \text{ cm}^{-1}$ . Gugus eter (C-O-C) ditunjukkan oleh puncak serapan pada  $1068 \text{ cm}^{-1}$ .

Spektrum FTIR K-TPP memiliki perbedaan dengan spektrum K-BMR. Pada K-TTP bilangan gelombang  $3434 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan intensitas serapan gabungan dari gugus  $\text{NH}_2$  dan OH dari kitosan. Puncak serapan tersebut lebih tajam dibandingkan dengan puncak serapan dari K-BMR yang menunjukkan semakin banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk. Tambahan ikatan hidrogen berasal dari gugus hidroksil pada TPP sebagai hasil dari reaksi *crosslinking* (ikat silang) antara kitosan dan TPP. Ikatan CH ditunjukkan oleh intensitas serapan pada  $2921 \text{ cm}^{-1}$  (CH simetris) dan  $2852$

$\text{cm}^{-1}$  (CH asimetris). Pada bilangan gelombang  $1630 \text{ cm}^{-1}$  puncak serapan N-H pada K-TPP lebih tajam dibandingkan dengan K-BMR yang menunjukkan derajat deasetilasi K-TPP lebih tinggi dibandingkan dengan K-BMR. Adanya

proses ikat silang antara TPP dan kitosan ditunjukkan dengan pita serapan baru dari K-TPP pada bilangan gelombang  $1262 \text{ cm}^{-1}$  yang berasal dari gugus P=O.



Gambar 1. Spektrum FTIR dari K-BMR dan K-TPP

### Uji Penghambatan *in vitro*

Hasil uji penghambatan secara *in vitro* menunjukkan bahwa K-TPP dan K-BMR mampu menghambat pertumbuhan fungi *C. gloeosporioides* masing-masing dengan kisaran penghambatan 20.99 – 95.06% dan 7.07 – 28.26%. Kitosan dapat menghambat pertumbuhan konidia, buluh kecambah, kelebatan hifa, panjang dan lebar hifa, serta melisis hifa pada fungi (Lauzardo *et al.*, 2009).

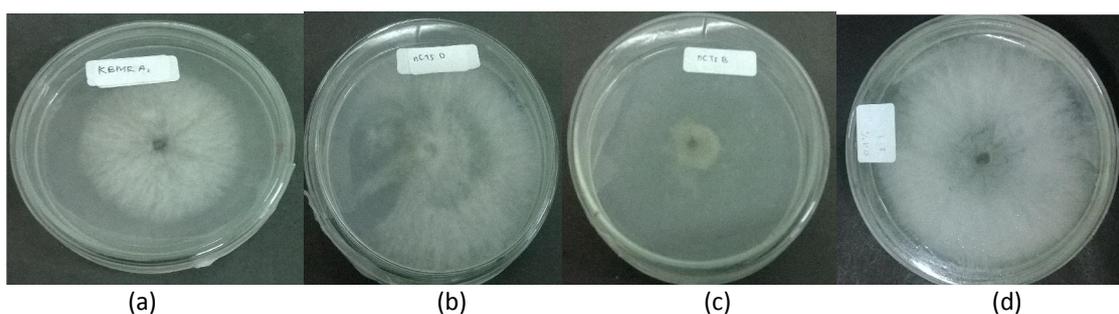
Aktivitas antifungi salah satunya dipengaruhi oleh konsentrasi kitosan. Pada konsentrasi K-BMR yang lebih rendah aktifitas antifungi cenderung mengalami penurunan yang ditunjukkan dengan nilai DH yang semakin menurun. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi molekul-molekul kitosan yang terlarut relatif rendah sehingga belum mampu untuk menghambat pertumbuhan fungi dengan sempurna.

Konsentrasi K-BMR yang paling efektif dalam menghambat *C. gloeosporioides* adalah 1.0% dengan nilai DH sebesar 88.89% (Tabel 1). Akan tetapi pada konsentrasi K-BMR yang lebih tinggi, yaitu pada 1.25% aktivitas antifungi justru mengalami penurunan. Hal tersebut dapat disebabkan pada konsentrasi yang tinggi viskositas dari larutan juga semakin tinggi sehingga menghalangi interaksi antara molekul kitosan dengan permukaan sel fungi. Hal tersebut sesuai dengan penelitian dari Li, *et al.*, (2008) yang menyatakan bahwa pada konsentrasi kitosan yang lebih tinggi dari konsentrasi optimumnya, daya penghambatannya akan semakin menurun ditunjukkan dengan koloni yang tebal dan memenuhi cawan petri.

Kitosan-tripolifosfat (K-TPP) memiliki rataan aktifitas antifungi yang lebih tinggi dibandingkan dengan K-

BMR. Aktifitas tertinggi diperoleh pada perlakuan K-TPP B dan K-TPP C dengan daya penghambatan masing-masing sebesar 95.06%. Aktifitas terendah ditunjukkan perlakuan K-TPP A, K-TPP D, dan K-TPP G dengan nilai DH masing-masing sebesar 20.99% (Tabel 1). Rendahnya aktifitas antifungi pada tiga perlakuan tersebut kemungkinan diakibatkan rendahnya interaksi antara kitosan dengan permukaan sel fungi akibat terhalang oleh molekul TPP

sebagai hasil proses ikat silang yang belum sempurna. Disamping itu distribusi molekul kitosan yang mungkin tidak merata pada media juga menjadi penyebab rendahnya aktivitas penghambatan kitosan. Hal tersebut dibuktikan pada ketiga perlakuan tersebut terdapat sisi-sisi yang tidak ditumbuhi oleh fungi, walaupun ruang di sekitarnya sudah dipenuhi oleh hifa dari fungi tersebut (Gambar 2).



**Gambar 2.** Contoh daya hambat secara *in vitro*, K-BMR A (a), K-TPP D (b), K-TPP B (c), kontrol (d)

**Tabel 1.** Uji daya hambat (DH) KTTP dan K-BMR secara *in vitro*

Perlakuan	[K-BMR] (%)	[TPP] (%)	Perbandingan volume (v/v)	Luas koloni fungi (cm <sup>2</sup> )	DH (%)
Kontrol	-	-	-	63.59	0.00
K-TPP A	0.2	0.1	5:1	50.24	20.99
K-TPP B	0.2	0.1	5:2	3.14	95.06
K-TPP C	0.2	0.08	5:1	3.14	95.06
K-TPP D	0.2	0.08	5:2	50.24	20.99
K-TPP E	0.1	0.1	5:1	19.63	69.14
K-TPP F	0.1	0.1	5:2	44.16	30.56
K-TPP G	0.1	0.08	5:1	50.24	20.99
K-TPP H	0.1	0.08	5:2	15.90	75.00
K-BMR A	0.25	-	-	28.26	55.56
K-BMR B	0.5	-	-	15.90	75.00
K-BMR C	1.0	-	-	7.07	88.89
K-BMR D	1.25	-	-	19.63	69.14

#### Uji Penghambatan *in vivo*

Hasil uji *in vivo* pada buah mangga setelah 4 hari masa inkubasi menunjukkan bahwa K-TPP lebih efektif

dalam menghambat pertumbuhan fungi. Hal tersebut diduga diakibatkan oleh ukuran dan berat molekul K-TPP yang lebih kecil. Adanya proses ikat silang

antara kitosan dengan TPP menyebabkan struktur K-TPP menjadi kompak, padat, dan akhirnya membentuk struktur tiga dimensi yang berukuran nano atau mikro. Permukaan pada partikel ini kaya dengan muatan positif sehingga lebih efektif untuk berikatan dengan plasma membran sel yang bermuatan negatif (Jovanović *et al.*, 2016). Muatan  $\text{NH}_3^+$  dari kitosan akan berkompetisi dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dari membran sel sehingga stabilitas sel fungi menjadi terganggu (Goy *et al.*, 2009). Hasil ini juga selaras dengan penelitian Ing *et al.*, (2012), dimana dinyatakan aktifitas kitosan yang berukuran nano atau mikro akan mempunyai aktifitas antifungi yang lebih besar dibandingkan dalam bentuk polimernya. Selain itu

dengan ukuran yang kecil, K-TPP lebih mudah berdifusi kedalam sel fungi untuk mengganggu aktifitas sintesis DNA dan RNA-nya (Ing *et al.*, 2012).

Daya hambat K-TPP diharapkan dapat mempunyai aktifitas yang tinggi pada ukuran molekul yang lebih kecil. Ukuran molekul ini antara lain dipengaruhi oleh konsentrasi kitosan, TPP, dan rasio volume antar keduanya (Mardliyati *et al.*, 2012) Konsentrasi kitosan yang besar akan memberikan daya hambat yang lebih besar. Hal ini terlihat pada K-TPP dengan konsentrasi 0.2% yang memiliki aktifitas penghambatan yang optimum dibandingkan dengan K-TPP dengan konsentrasi 0.1% (Tabel 2).

**Tabel 2. Uji daya hambat K-TPP terhadap antraknosa pada buah mangga secara *in vivo***

Perlakuan	[K-BMR] (%)	[TPP] (%)	Perbandingan volume (v/v)	Rata-rata Intensitas keparahan (%)	DH (%)
Kontrol	-	-	-	70,5	0,00
K-TPP A	0,2	0,1	5:1	20,5	70,92
K-TPP B	0,2	0,1	5:2	5,25	92,55
K-TPP C	0,2	0,08	5:1	5,25	92,55
K-TPP D	0,2	0,08	5:2	40,5	42,55
K-TPP E	0,1	0,1	5:1	20,5	70,92
K-TPP F	0,1	0,1	5:2	10,5	85,11
K-TPP G	0,1	0,08	5:1	20,5	70,92
K-TPP H	0,1	0,08	5:2	5,25	92,55

Konsentrasi TPP juga berpengaruh terhadap K-TPP yang terbentuk, hasil menunjukkan bahwa konsentrasi TPP yang lebih kecil membuat K-TPP yang terbentuk memiliki DH yang lebih besar. Hal ini dapat terlihat pada K-TPP G dan H memiliki rata-rata DH yang lebih besar dibandingkan dengan rata-rata DH K-TPP E dan F. Rasio volume antara kitosan dan TPP juga berpengaruh, kitosan dengan volume yang lebih besar akan memberikan nilai DH yang lebih besar. Akan tetapi, terlihat bahwa pada

rasio 5:2 memberikan rata-rata nilai DH yang hampir serupa dengan rasio 5:1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada penelitian ini kedua rasio tersebut tidak terlalu berpengaruh pada daya hambat K-TPP yang terbentuk.

K-TPP B dan C paling efektif dalam menghambat pertumbuhan fungi dengan nilai DH sebesar 92.55% (Tabel 2). Hasil analisa PSA (*Particle Size Analyzer*) menunjukkan bahwa rata-rata ukuran molekul B dan C sebesar 143,7 nm dan 142,1 nm. Walaupun demikian nilai indeks polidispersitas (IP) dari K-

TPP B cukup rendah yaitu sebesar 0.488, sedangkan untuk K-TPP C nilai IP masih kurang, yaitu 0.638. Nilai IP ini menunjukkan distribusi molekul dalam larutan, semakin tinggi nilai IP maka molekul-molekulnya semakin tidak seragam. Keceragaman molekul akan berpengaruh terhadap efektivitas penghambatan, umumnya semakin rendah nilai IP maka efektivitas penghambatannya semakin besar (Ing *et al.*, 2012). Akan tetapi pada penelitian ini nilai IP tersebut tidak berpengaruh terhadap DH yang dihasilkan. Hasil penelitian uji PSA sebelumnya melaporkan bahwa perbandingan K-TPP (3:1) menunjukkan nilai rata-rata ukuran nano kitosan yaitu 228,74 nm (Mulyaningtyas *et al.*, 2016).

## KESIMPULAN

K-TPP menunjukkan aktifitas penghambatan terhadap *C. gloeosporioides* yang lebih besar dibandingkan dengan K-BMR. Aktifitas ini dipengaruhi oleh ukuran K-TPP yang lebih kecil dibandingkan dengan K-BMR.

Aktifitas penghambatan terbaik secara *in vitro* dan *in vivo* diperoleh dari perlakuan K-TPP B [0.2 % K-BMR : 0.1% TPP; (5:2)] dan K-TPP C [0.2 % K-BMR : 0.08% TPP; (5:1)].

Hasil analisa PSA (*Particle Size Analyzer*) menunjukkan bahwa rata-rata ukuran molekul B dan C sebesar 143,7 nm dan 142.1 nm.

Perlu dilakukan optimasi terhadap K-TPP agar ukuran yang terbentuk semakin kecil. Selain itu, analisis viskositas, bobot molekul, dan pH juga perlu dilakukan karena hal tersebut juga menentukan validasi terhadap struktur K-TPP yang terbentuk.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Rosidah Rahman dan teknisi Lab. Nanoteknologi BB Pasca

Panen serta Biofarmaka IPB atas bantuan dalam analisis nanopartikel dan FTIR.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., & Siddiqui, Y. (2013). Effectiveness of submicron chitosan dispersions in controlling anthracnose and maintaining quality of dragon fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 147–153.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569–3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
- Gonzalez-Aguilar, G. A., Celis, J., Sotelo-Mundo, R. R., De La Rosa, L. A., Rodrigo-Garcia, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2008). Physiological and biochemical changes of different fresh-cut mango cultivars stored at 5°C. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(1), 91–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01394.x>
- Goy, R. C., Britto, D. De, & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros: Ciencia et Tecnologia*. 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Hewajulige, I., Sultanbawa, Y., & Wijeratnam, S. W. (2009). Mode of action of chitosan coating on anthracnose disease control in papaya. *Phytoparasitica*. 37, 437–444. <https://doi.org/10.1007/s12600-009-0052-5>
- Hu, M., Yang, D., Huber, D. J., Jiang, Y., Li, M., Gao, Z., & Zhang, Z. (2014). Reduction of postharvest

- anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 97, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.06.013>
- Ing, L. Y., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
- Palma-Guerrero J., Jansson H.B., Salinas, J., & Liorca, L.V.L. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi, *J. of Applied Microbiology* 104, 541–553. <https://doi.org/10.1111/j.13652672.2007.03567.x>
- Jovanović, G. D., Klaus, A. S., & Nikšić, M. P. (2016). Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.02.003>
- Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., Gowda, L.R., & Tharanathan, R.N. (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*. 1770: 495-505. (2007).
- Lauzardo, A.N.H., Del Valle, M.G.V., Castelan, L.V., Giorgana, G.E.M., & Sánchez, M.G.G. (2009). Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained from peach, papaya and tomato, *Fruits* 65(4), 245–253. <https://doi.org/10.1051/fruits/2010020>
- Li, X.F., Feng, X.Q., Yang, S., Wang, T.P., & Su, Z.X. (2008). Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Iranian Polymer Journal*, 17(11), 843–852.
- Mardiyati, E., Sjaikhurizal E.M, Damai R.S. 2012. *Sintesis nanopartikel kitosan-trypoly phosphate dengan metode gelasi ionik: Pengaruh konsentrasi dan rasio volume terhadap karakteristik partikel*. Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan; 2012 (Okt 3); Serpong, Indonesia. Serpong (ID): BPPT. hlm 90-93.
- Sharma, M & Kulshrestha, S. (2018). *Colletotrichum gloeosporioides* : An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12 (2), 1-14. <https://doi.org/10.13005/bbra/1776>
- Mulyaningtyas, D., A, Purwantisari, S., Kusdiyantini, E., & Suryadi, Y. (2016). Produksi kitosan secara enzimatik oleh *Bacillus firmus* E65 untuk pengendalian penyakit antraknosa pada buah mangga (*Mangifera Indica* L.). *Jurnal Biologi*, 5(4), 8–17.
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Samudra, I. M., Susilowati, D. N., Patricia, & Irawati, W. (2013). Karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri endofitik penghambat jamur patogen Padi. *Buletin Plasma Nutfah*, 19(1), 25–32.
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., Samudra, I. M., Susilowati, D., & Sriharyani, T. S. (2017). Control of anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) using nano chitosan hydrolyzed by chitinase derived from *Burkholderia cepacia* isolate E76, *J. Agrobiogen* 13(2), 111–122.

Toharisman. (2015). Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 733–738. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-4797-1>

Zhong, Z., Chen, R., Xing, R., Chen, X., Liu, S., Guo, Z., & Li, P. (2007). Synthesis and antifungal properties of sulfanilamide derivatives of chitosan. *Carbohydrate Research*. 342 (16): 2390–2395. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.07.015>