

PRODUKSI KITOSAN SECARA ENZIMATIK OLEH *Bacillus firmus* E65 UNTUK PENGENDALIAN PENYAKIT ANTRAKNOSA PADA BUAH MANGGA (*Mangifera Indica* L.)

Dwina Mulyaningtyas¹, Susiana Purwantisari¹, Endang Kusdiyantini¹, Yadi Suryadi²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

²Bidang Biokimia, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor
email : dwinaamtyas@gmail.com

ABSTRACT

Anthrachnose is postharvest disease on mango caused by fungi *Colletotrichum gloeosporioides*. Anthrachnose can be inhibited development by chitosan as a preservative anti-fungal for fruit. Effectiveness of chitosan can be increased by enzymatic hydrolyze method to obtain a low molecular weight chitosan. Low molecular weight chitosan can be reducing the particle size into nano chitosan. This study aims to obtain the low molecular weight of chitosan by hydrolyzing the commercial chitosan enzymatically using *B. firmus* E65, the production of nano chitosan with *ionic gelation* method and to determine the volume ratio of low molecular weight of chitosan and natrium tripolifosfat (NaTPP) to conduct *in vitro* and *in vivo* inhibition on the growth of fungi *C. gloeosporioides*. The method consist of the production of chitinase from *B. firmus* E65, the production chitinase of low molecular weight chitosan, ionic gelation, *in vitro* and *in vivo* nanochitosan bioassay test on the growth of *C. gloeosporioides*. The research result showed that the activity of the crude extract of chitinase is 0.05 U/mL and the purity is 0.07 U/mL. The spesific activity value of crude extract is 0.44 U/mg, and the purity is 0.82 U/mg. The purity level of crude extract is increased 0.83 times from 1 to 1.83 times after purification process. Molecular weight of enzymatically hydrolyzed chitosan is 511.850 Kda. *In vitro* and *in vivo* bioassay showed the best result on the growth of *C. gloeosporioides* are 90 and 91% is obtained in the combination 3:1 of the low molecular weight chitosan and NaTTP. This comparison showed that the size of nano chitosan is 228.74 and the polidispesity index is 0.884. **Keywords** : Chitinase, chitosan, *B. firmus* E65, antrachnose, *C. gloeosporioides*.

ABSTRAK

Antrachnosa merupakan penyakit pascapanen pada mangga yang disebabkan oleh jamur *Colletotrichum gloeosporioides*. Penyakit ini dapat dihambat perkembangannya dengan kitosan sebagai pengawet yang bersifat anti jamur untuk buah. Efektivitas kitosan dapat ditingkatkan dengan hidrolisis kitosan secara enzimatik untuk memperoleh kitosan dengan berat molekul rendah (KBMR). KBMR dapat diperkecil ukuran partikelnya menjadi nano kitosan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan KBMR dari kitosan komersial hasil hidrolisis oleh *B. firmus* E65 secara enzimatik, memproduksi nano kitosan dengan metode *gelasi ionik* dan menentukan perbandingan volume KBMR dan natrium tripolifosfat (NaTPP) yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo*. Metode yang dilakukan yaitu memproduksi kitinase dari *B. firmus* E65, pembuatan KBMR dari hasil produksi kitinase *B. firmus* E65, nano kitosan dengan metode *gelasi ionik*, dan uji bioassay nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas kitinase ekstrak kasar 0,05 U/mL dan kemurnian 0,07 U/mL. Aktivitas spesifik ekstrak kasar 0,44 U/mg, dan kemurnian 0,82 U/mg. Tingkat kemurnian kitinase ekstrak kasar 1 kali dan setelah dipurifikasi meningkat menjadi 1,83 kali. Berat molekul kitosan yang dihidrolisis secara enzimatik 511,85 Kda. Hasil terbaik bioassay pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo* diperoleh pada perbandingan volume KBMR dan NaTTP 3:1 yaitu 90% dan 91%. Perbandingan ini menunjukkan ukuran nano kitosan 228,74 nm dan indeks polidispersitasnya 0,884.

Kata Kunci: Kitinase, kitosan, *B. firmus* E65, antraknosa, *C. gloeosporioides*

PENDAHULUAN

Mangga (*Mangifera indica* L.) merupakan salah satu dari buah-buahan tropis musiman yang penting di Indonesia. Permasalahan yang dihadapi produsen dalam usaha pengembangan produksi dan kualitas buah mangga yaitu adanya kerusakan paling awal yang disebabkan oleh infeksi jamur patogen pada tanaman hingga buahnya. Antraknosa adalah penyakit utama pascapanen pada mangga yang disebabkan oleh jamur *Colletotrichum gloeosporioides* (Alemu *et al.*, 2014).

C. gloeosporioides dapat menyerang mangga yang belum matang di pohon, kemudian penyakit berkembang selama penyimpanan. Spora yang berkecambah membentuk apresorium dan tidak berkembang hingga buah dipanen dan matang (Mahneli, 2007). Gejala serangan antraknosa pada saat pascapanen ditandai dengan bercak bewarna coklat gelap, cekung, dan berbentuk bulat yang terdapat pada permukaan kulit. Bercak akan semakin meluas dan memasuki daging buah jika tingkat serangan semakin parah (Alemu *et al.*, 2014).

Pengendalian penyakit antraknosa secara kimia dengan penggunaan fungisida seperti carbendazim, benomyl, dan orthiophantemethyl memiliki dampak negatif terhadap lingkungan, toksik bagi makhluk hidup, serta menimbulkan resistensi terhadap mikroba (Yulia and Widiyanti, 2007).

Alternatif penghambat penyakit antraknosa yang ramah lingkungan dapat dilakukan, salah satunya dengan menggunakan kitosan. Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang glukosamin (2-amino-2-deoksi- (1-4)-D-Glukosa) (Singh and Deep, 2011). Menurut Pamekas *et al.* (2009), kitosan merupakan satu-satunya selulosa yang dapat dimakan, tidak beracun, dapat menginduksi enzim kitinase yang dapat mendegradasi kitin, sehingga dapat digunakan sebagai biofungisida.

Efektivitas kitosan sebagai fungisida dapat ditingkatkan dengan hidrolisis kitosan secara enzimatik untuk memperoleh kitosan dengan berat molekul rendah (KBMR). Enzim yang berperan dalam proses hidrolisis kitosan komersial adalah enzim kitinase yang dapat dihasilkan dari kelompok bakteri kitinolitik seperti *Bacillus firmus* E65. *B. firmus* dapat menghasilkan enzim kitinase yang dapat mendegradasi dinding sel jamur.

KBMR dapat diperkecil ukuran partikelnya menjadi nano kitosan. Nano kitosan yaitu kitosan yang memiliki ukuran antara 100-400 nm. Kelebihan dari nano kitosan yaitu bersifat tidak toksik, meningkatkan daya adsorpsi kitosan, meningkatkan kemampuan penghantaran, dan memiliki stabilitas yang konstan (Mohanraj and Chen, 2006). Nanopartikel menggunakan biopolimer kitosan dilakukan dengan metode *gelasi ionik*, dimana nanopartikel terbentuk oleh interaksi elektrostatik antara muatan positif polimer dan muatan negatif polianion seperti natrium tripolifosfat (NaTPP) yang bekerja sebagai ikatan silang. NaTPP dapat menguraikan KBMR menjadi nanopartikel yang bersifat lebih stabil dan memiliki sifat dapat menembus membran yang lebih baik (Lien *et al.*, 2008). Perbandingan volume KBMR dan NaTPP dapat menunjukkan efektivitas terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo*.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini melakukan produksi kitosan secara enzimatik oleh *B. firmus* E65 dan mendapatkan nano kitosan yang stabil dan bersifat antifungi terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi, Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor. Buah mangga jenis manalagi yang diperoleh dari supermarket yang berada di Bogor, kitosan

komersial (Sigma BM 800 Kda), koloid kitin, NaTPP 0,1%, dan tween-80.

Preparasi Kitinase

a. Pembuatan Starter *B. firmus* E65

Pembuatan starter *B. firmus* E65 dilakukan dengan menginokulasikan dua ose kultur *B. firmus* E65 usia 24 jam dari media NA miring, kemudian diinokulasikan ke dalam 20 mL media LB. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan agitasi 100 rpm.

b. Produksi Kitinase

Starter diambil sebanyak 10 mL, ditambahkan kedalam 200 mL media kitin cair dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang dengan agitasi 150 rpm dalam *orbital shaker*. Media kitin cair disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan merupakan ekstrak kasar kitinase

c. Ekstraksi Kitinase

Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 2,5 mL dan dicampur dengan ammonium sulfat (NH₄)₂SO₄ 70% sebanyak 2,5 mL, dihomogenkan dengan vorteks. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet yang diperoleh dipisahkan dan dilarutkan dalam 1 mL PBS pH 6,8. Enzim tersebut disimpan pada suhu -21°C.

Pengukuran Aktivitas Kitinase

a. Pembuatan Kurva Standar N-asetilglukosamin

Pengukuran standar yang terdiri atas 5 mL N-asetilglukosamin yang memiliki konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm dan ditambahkan 5 mL pereaksi Schales. Blanko terdiri atas 5 mL akuades dan 5 mL pereaksi Schales. Campuran tersebut divorteks dan dididihkan pada suhu 100°C selama 10 menit. Larutan didinginkan dan absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 420 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

b. Uji Aktivitas Kitinase

Ekstrak kasar enzim sebanyak 150 µL, 150 µL PBS pH 7, dan 300 µL koloid kitin dimasukkan dalam tabung *ependorf* dan divorteks. Enzim diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 500 µL dan ditambahkan dengan 500 µL akuades dan 1 mL pereaksi Schales. Larutan divorteks dan dididihkan pada suhu 100°C dalam *waterbath* selama 10 menit. Sampel didinginkan dan absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 420 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol N-asetil-D-glukosamin per menit.

Pengukuran Konsentrasi Protein dengan Metode Bradford

a. Pembuatan Kurva Standar Albumin

Kadar protein kitinase diukur secara kuantitatif menggunakan metode Bradford. Deret konsentrasi yang dibuat terdiri atas 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Pengukuran protein standar dilakukan dengan mencampurkan 0,1 mL larutan albumin dengan 5 mL pereaksi Bradford. Blanko terdiri atas 0,1 mL akuades dan 5 mL pereaksi Bradford. Larutan sampel terdiri atas 0,1 mL enzim kitinase dan 5 mL pereaksi Bradford. Campuran tersebut divorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

b. Pengukuran Konsentrasi Protein pada Sampel

Larutan sampel terdiri atas 0,1 mL kitinase dan 5 mL pereaksi Bradford. Sampel dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Preparasi Kitosan Berat Molekul Rendah (KBRM)

Kitosan komersial sebanyak 2 g dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 1%

dan diukur pHnya menjadi 3,5. Campuran tersebut diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 24 jam. Kitosan yang telah larut disaring dan ditambahkan 0,1 N NaOH agar pHnya menjadi 5,3. Larutan kitosan sebanyak 20 mL ditambahkan 0,2 mL ekstrak kasar enzim. Larutan tersebut dimasukkan dalam *waterbath* pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 24 jam. Proses hidrolisis dihentikan dengan pemanasan 100°C dalam *waterbath* selama 5 menit, kemudian ditambahkan NaOH 2 N sebanyak 5,1 mL. Kitosan hasil hidrolisis dimasukkan dalam alat *freeze dryer* selama 36 jam, sehingga kitosan berbentuk serbuk. Serbuk tersebut merupakan kitosan berat molekul rendah (KBMR).

Penentuan Berat Molekul KBMR dengan menggunakan Viskometer Ostwald

Larutan standar kitosan berbagai konsentrasi (0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04 dan 0,05%) (b/v) dibuat dalam pelarut 0,10 M asam asetat 0,02 M natrium klorida. Waktu alir dihitung saat cairan mengalir dari garis (*index line*) pertama ke *index line* kedua. Masing-masing perlakuan dilakukan sepuluh kali ulangan, dan dihitung nilai rata-ratanya. Berdasarkan waktu alir larutan kitosan dan pelarut murni akan diperoleh viskositas relatif, spesifik, reduktif, dan intrinsik melalui persamaan Huggins dan persamaan Mark-Hauwink, yaitu:

$$\text{reduktif} = [\eta] + K'[\eta]^2 C$$

$$[\eta] = K \cdot M_v^a$$

Keterangan:

K' = konstanta Huggins

$$\text{relatif} = \frac{\text{Laju alir larutan kitosan}}{\text{Laju alir pelarut}}$$

$$\text{spesifik} = \text{relatif} - 1$$

$$\text{reduktif} = \frac{\eta \text{ spesifik}}{\text{Konsentrasi kitosan}}$$

= viskositas intrinsik

K = konstanta ($3,04 \times 10^{-5}$)

M = berat molekul (kDa)

= konstanta (1,26)

Pembuatan Nano Kitosan dengan Metode Gelasi Ionik

Serbuk KBMR sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam asam asetat 1% (b/v),

sehingga menjadi larutan KBMR 0,2% (v/v). Larutan KBMR 0,2% diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 30 menit dan diukur pHnya menjadi 4. Larutan KBMR 0,2% ditambahkan tween-80 0,2% setetes demi setetes hingga 0,25 mL dan tetap diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan ditambah dengan NaTPP 0,1 % setetes demi setetes (sesuai dengan volume yang telah ditentukan), dan tetap diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Perbandingan volume antara larutan KBMR dan NaTPP adalah 1:1, 1:2, 3:1, 3:2, 5:1, dan 5:2. Suspensi nano kitosan disimpan pada suhu 4°C sebelum dilakukan pengujian.

Uji Bioassay Nano Kitosan terhadap Jamur *C. gloeosporioides* secara *In Vitro*

Media PDA dalam cawan petri yang masih hangat ($\pm 40^\circ\text{C}$) dicampurkan dengan 1 mL larutan KBMR dan NaTPP, kemudian media dibiarkan hingga mengeras. Media PDA dalam cawan petri tersebut kemudian dilubangi bagian tengahnya dengan alat *cork borer*. Kultur *C. gloeosporioides* dari media PDA diambil dengan alat *cork borer*, selanjutnya diletakkan ke lubang tersebut, diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang. Perlakuan kontrol hanya berisi media PDA dan jamur *C. gloeosporioides*. Perlakuan pada uji *in vitro* dilakukan pada media PDA dan ditambahkan dengan larutan KBMR dan NaTPP (1:1, 1:2, 3:1, 3:2, 5:1, dan 5:2). Masing-masing perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Pengukuran pertumbuhan luas miselia jamur diamati setiap hari hingga variabel kontrol tumbuh memenuhi cawan petri.

Uji Bioassay Nano Kitosan terhadap Jamur *C. gloeosporioides* secara *In Vivo*

a. Isolasi dan Identifikasi Jamur

Buah mangga manalagi disterilkan permukaannya dengan merendam dalam larutan natrium hipoklorit 1% selama 1 menit, kemudian buah dibilas dengan air steril sebanyak 2 kali masing-masing selama 1 menit dan dikeringanginkan. Buah dipotong kecil (kira-kira 3 x 3mm) jaringan buah terinfeksi dan bergejala antraknosa

dalam kondisi aseptis menggunakan scalpel steril. Potongan buah kemudian diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi media PDA, diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari, kemudian diinokulasikan kembali pada media PDA baru.

Pengamatan koloni secara makroskopis meliputi warna, penyebaran, arah pertumbuhan, pinggiran, dan kerapatan miselium. Pengamatan koloni secara mikroskopis dilakukan dengan dibuat preparat dan diamati dibawah fotomikrograf. Identifikasi dilakukan dengan mencocokkan karakteristik jamur yang diperoleh dari hasil pengamatan dengan buku identifikasi menurut Alexopoulos dan Balackwell (1979) dan Crous *et al.*, (2009).

b. Pengaruh Nano Kitosan pada Pertumbuhan Jamur *C. gloeosporioides* secara *In vivo*

Terdapat tiga perlakuan dalam uji *in vivo* yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan buah dengan diberi perlakuan. Perlakuan kontrol negatif yaitu buah tanpa diimersikan dengan suspensi konidia *C. gloeosporioides*, dan larutan KBMR dan NaTPP, selanjutnya diisolasi dan diidentifikasi. Perlakuan kontrol positif yaitu buah diimersikan dengan suspensi konidia *C. gloeosporioides*, namun tanpa diimersikan dengan larutan KBMR dan NaTPP. Sedangkan buah dengan diberi perlakuan dilakukan dengan cara buah diimersikan dalam larutan KBMR dan NaTPP (1:1, 1:2, 3:1, 3:2, 5:1, dan 5:2), sebanyak 15 mL di dalam cawan petri steril menggunakan kuas steril selama 2 menit, dan dikeringanginkan. Buah ditusuk-tusuk menggunakan jarum steril secara merata dan diimersikan dengan suspensi konidia *C. gloeosporioides* (10^6) menggunakan kuas steril secara merata sebanyak 15 mL dalam cawan petri steril selama 2 menit, kemudian dikeringanginkan. Percobaan yang sama diulang sebanyak 3 kali.

Buah disimpan di atas baki steril yang bagian dalamnya dialasi dengan tisu yang telah dibasahi dengan alkohol. Baki dibungkus dengan plastik bening. Pengamatan sampel dilakukan setelah 7 hari hingga hari ke-11. Luas koloni jamur dihitung dengan cara jamur yang ada pada

mangga ditandai dengan plastik bening. Bagian yang telah ditandai kemudian dijiplak menggunakan kertas millimeter blok dan dihitung. Keefektifan perbandingan volume KBMR dan NaTPP dapat diukur dengan menghitung daya hambat yang diperoleh dari persentase luas koloni terhadap luas total permukaan mangga

Pengukuran Partikel dengan *Particle Size Analyzer* (PSA)

Hasil perbandingan volume KBMR dan NaTPP yang diperoleh dari uji bioassay nano kitosan terhadap jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo* yang terbaik, selanjutnya dianalisis dengan menggunakan PSA untuk mengetahui ukuran partikel dan indeks polidispersitas. Pengukuran partikel menggunakan PSA diawali dengan suspensi nano kitosan 1 mL dimasukkan kedalam kuvet alat PSA setetes demi setetes hingga konsentrasi mencukupi. Perangkat lunak dijalankan.

Analisis Data

Rancangan percobaan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 7 perlakuan dan tiga ulangan. Data dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dan uji lanjut LSD dengan taraf signifikansi 5% menggunakan program SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Aktivitas Kitinase

Hasil pengukuran aktivitas kitinase disajikan dalam Tabel 1. Berdasarkan hasil tersebut, terdapat perbedaan antara ekstrak kasar dan yang telah dipurifikasi dengan ammonium sulfat 70%. Kadar protein yang diperoleh dari hasil pengendapan dengan menggunakan ammonium sulfat, digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik kitinase. Semakin tinggi kadar protein, maka semakin kecil nilai aktivitas spesifik dan sebaliknya.

Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim. Semakin tinggi tingkat kemurnian enzim maka semakin tinggi pula aktivitas spesifik enzim. Haliza and Suhartono (2001), menyatakan bahwa

nilai aktivitas spesifik meningkat selama pemurnian suatu enzim dan menjadi

maksimum dan tetap (konstan) jika enzim sudah berada pada keadaan murni.

Tabel 1 Hasil Pengukuran Aktivitas Kitinase

Sampel enzim	Volume kitinase (mL)	Aktivitas kitinase (U/mL)	Kadar protein kitinase (mg/mL)	Total aktivitas kitinase (U)	Protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian (kali)
Ekstrak kasar	200	0,05	0,12	10	24	0,41	1
Purifikasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	0,08	0,09	0,4	0,45	0,88	2,14

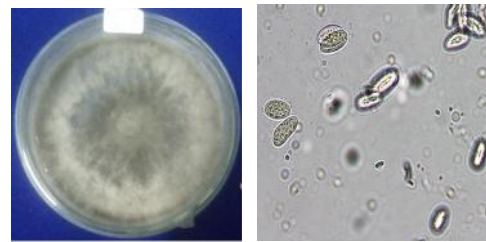
Berat Molekul KBMR

Berat molekul KBMR diperoleh 511,85 kDa. Penurunan berat molekul kitosan setelah hidrolisis secara enzimatik ini terjadi karena adanya pemutusan ikatan - glikosidik pada rantai polimer kitosan menjadi lebih pendek dan berat molekul kitosan menjadi lebih rendah. Kerja enzim pada hidrolisis enzimatik ini dipengaruhi oleh konsentrasi enzim dan substrat dalam reaksi. Besarnya konsentrasi enzim yang digunakan akan mempengaruhi banyaknya substrat yang ditransformasi. Kitosan dengan berat molekul rendah dapat diaplikasikan sebagai material menghambat pertumbuhan bakteri atau jamur yang lebih efektif.

Karakteristik Jamur *Colletotrichum gloeosporioides*

Morfologi yang teramati secara makroskopis pada media PDA menunjukkan bahwa koloni jamur berwarna putih, dengan bagian bawah berwarna hitam. Penyebaran koloni melingkar secara konsentris, arah pertumbuhan koloni kesamping dan keatas, kerapatan miselium yaitu tebal dan rapat, pinggiran koloni tidak rata dan terdapat bintik-bintik yang membentuk lingkaran berwarna merah muda pada hari kedua, setelah hari keempat miselium yang berwarna putih berubah menjadi kelabu. Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa jamur mempunyai hifa yang bersepta, mula-mula hialin dan akan menjadi gelap, konidia yang berbentuk silindris dengan ujung yang membulat atau tumpul, berwarna bening, dan berukuran $8 \times 5 \mu\text{m}$. Miselium

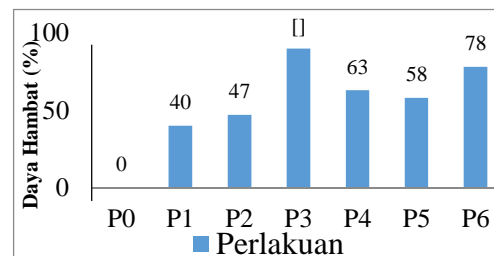
koloni jamur *C. gloeosporioides* berwarna kelabu dan hifa bersekat.



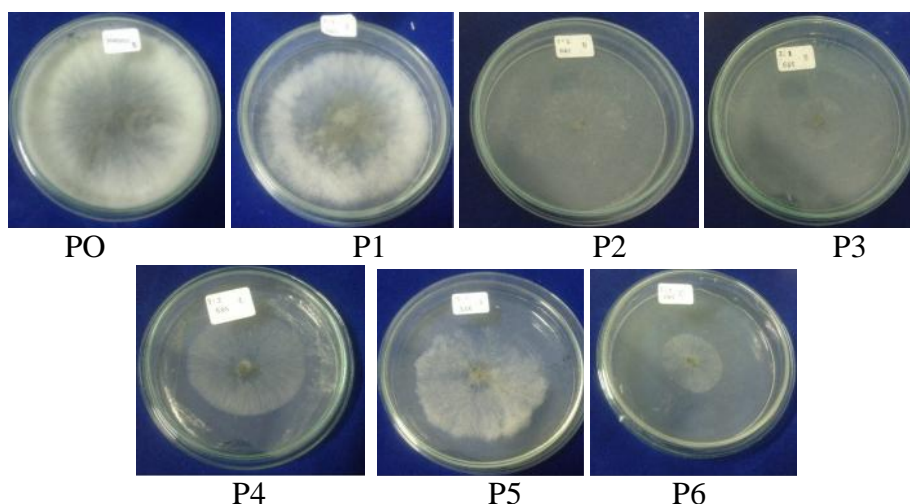
Gambar 1. (a) makroskopis jamur *C. gloeosporioides* pada media PDA dan (b) mikroskopis jamur *C. gloeosporioides* pada perbesaran 400 kali.

Bioassay Nano Kitosan terhadap Pertumbuhan Jamur *C. gloeosporioides* secara *In Vitro*

Persentase daya hambat untuk menekan pertumbuhan patogen *C. gloeosporioides* yang tertinggi yaitu pada perbandingan volume KBMR dan NaTPP 3:1 sebesar 90%, dan persentase daya hambat terendah yaitu pada perbandingan volume KBMR dan NaTPP 1:1 yaitu sebesar 40% (Gambar 4.)



Gambar 2. Daya hambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* pada variasi perbandingan volume KBMR dan NaTPP secara *in vitro*



Gambar 3. Bioassay nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro*.

Penelitian yang dilakukan oleh Laili *et al.* (2014), menyatakan bahwa rasio massa kitosan dan NaTPP pada formula optimum terpilih adalah 3:1, dan ukuran partikel yang diperoleh adalah $13,2 \pm 2,6$ nm. Meningkatnya konsentrasi atau massa NaTPP yang ditambahkan dalam sistem nanopartikel menyebabkan jumlah gugus negatif ion fosfat ($P_3O_{10}^{5-}$) yang terionisasi juga semakin banyak. Pada rasio ini jumlah kitosan lebih melimpah dibandingkan dengan jumlah NaTPP, sehingga jika konsentrasi atau masa kitosan ditingkatkan maka gugus amin kitosan (NH_3^+) akan semakin melimpah namun tidak diimbangi dengan gugus ion fosfat ($P_3O_{10}^{5-}$) yang tersedia dalam sistem. Hal ini menyebabkan interaksi taut silang yang terjadi menurun.

Tabel 1. Analisis statistika daya hambat nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro*

Perlakuan	Daya Hambat
P0	$0,0 \pm 0,0^a$
P1	$40,00 \pm 26,66^a$
P2	$47,33 \pm 27,31^{ab}$
P3	$89,66 \pm 1,15^d$
P4	$63,00 \pm 13,52^{bcd}$
P5	$58,00 \pm 19,97^{bc}$
P6	$78,33 \pm 5,85^d$

Keterangan: Angka-angka dalam baris yang sama dan diikuti oleh huruf superscript berbeda^{bc} menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji LSD, $\alpha = 0,05\%$

P0 = Kontrol

P1 = KBMR : NaTPP (1:1)

P2 = KBMR : NaTPP (1:2)

P3 = KBMR : NaTPP (3:1)

P4 = KBMR : NaTPP (3:2)

P5 = KBMR : NaTPP (5:1)

P6 = KBMR : NaTPP (5:2)

Hasil uji lanjut LSD terlihat bahwa adanya perbedaan antara P0 dan P1 berbeda nyata dengan semua perlakuan. P2, P4, dan P5 tidak berbeda nyata satu sama lain tetapi berbeda nyata dengan P3, P6. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan antara perbandingan volume KBMR dan NaTPP terhadap daya hambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*.

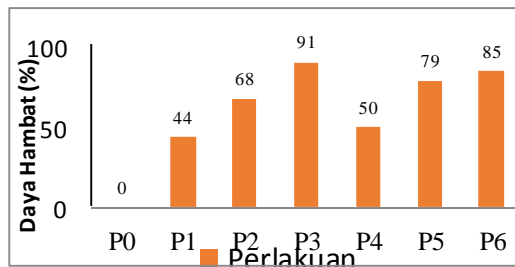
Kitosan memiliki kemampuan sebagai antijamur sehingga dapat terjadi penghambatan pertumbuhan jamur. Menurut Hamdayanty *et al.* (2012), kitosan mampu merusak dinding sel jamur umumnya tersusun atas lipopolisakarida yang merupakan lemak dan protein. Mekanisme antifungi kitosan dapat terjadi pada level ekstraseluler maupun intraseluler. Pada mekanisme ini, kitosan harus mempunyai berat molekul kecil agar dapat masuk dalam sel mikroorganisme.

Gugus amino dalam bentuk asetil amino ($HCOCH_3$) dan glukosamin ($C_6H_9NH_2$) dalam kitosan yang bermuatan positif dapat berikatan dengan bagian makromolekul bermuatan negatif pada permukaan sel

jamur. Hal ini menyebabkan apresorium (ujung hifa atau tabung kecambah yang membengkak yang berguna untuk menempelkan dan mempenetrasi inang oleh jamur) dan pertumbuhan jamur akan terhambat. Selain itu, pasangan elektron bebas dari gugus amina pada nano kitosan akan menarik mineral Mg^{2+} dari sel jamur. Mg^{2+} merupakan kofaktor enzim DNA polymerase, apabila sel kehilangan Mg^{2+} maka enzim tersebut tidak teraktivasi sehingga proses replikasi dan transkripsi DNA akan terhambat. Hal ini akan menghambat pertumbuhan jamur secara luas dan mengakibatkan kematian sel jamur (Restuati, 2008).

Bioassay Nano Kitosan terhadap Pertumbuhan Jamur *C. gloeosporioides* secara *In Vivo*

Persentase daya hambat jamur paling baik ditunjukkan pada perbandingan KBMR dan NaTPP 3:1 sebesar 91%, dan persentase daya hambat terendah yaitu perbandingan volume KBMR dan NaTPP 1:1 yaitu sebesar 44% (Gambar 5).



Gambar 4. Daya hambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* pada variasi perbandingan volume KBMR dan NaTPP secara *in vivo*

Proses infeksi *C. gloeosporioides* dimulai dengan melekatnya spora pada permukaan kulit buah, kemudian spora berkecambah dan membentuk appressoria dan hifa untuk menginfeksi dan tetap tinggal (dorman) dalam lapisan sel pada kulit dalam kondisi laten. Aktivasi konidia dan apresoria dormant diinduksi oleh etilen yang dihasilkan buah selama proses fisiologis pematangan. Semakin tua dan matangnya buah, maka jamur yang dormant akan berangsur-angsur

berkembang sehingga menjadi aktif kembali dan memperlihatkan gejala serangan sehingga buah menjadi busuk. Perkembangan jamur semakin cepat dengan semakin matangnya buah setelah dipanen.

Tabel 2. Analisis statistika daya hambat nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vivo*

Perlakuan	Daya Hambat
P0	$0,0 \pm 0,0^a$
P1	$43,66 \pm 18,00^a$
P2	$68,00 \pm 14,42^{bc}$
P3	$91,33 \pm 6,02^d$
P4	$50,00 \pm 11,00^b$
P5	$78,66 \pm 12,58^{cd}$
P6	$84,66 \pm 9,07^d$

Keterangan: Angka-angka dalam baris yang sama dan diikuti oleh huruf superscript berbedabc menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji LSD, = 0,05%

P0 = Kontrol

P1 = KBMR : NaTPP (1:1)

P2 = KBMR : NaTPP (1:2)

P3 = KBMR : NaTPP (3:1)

P4 = KBMR : NaTPP (3:2)

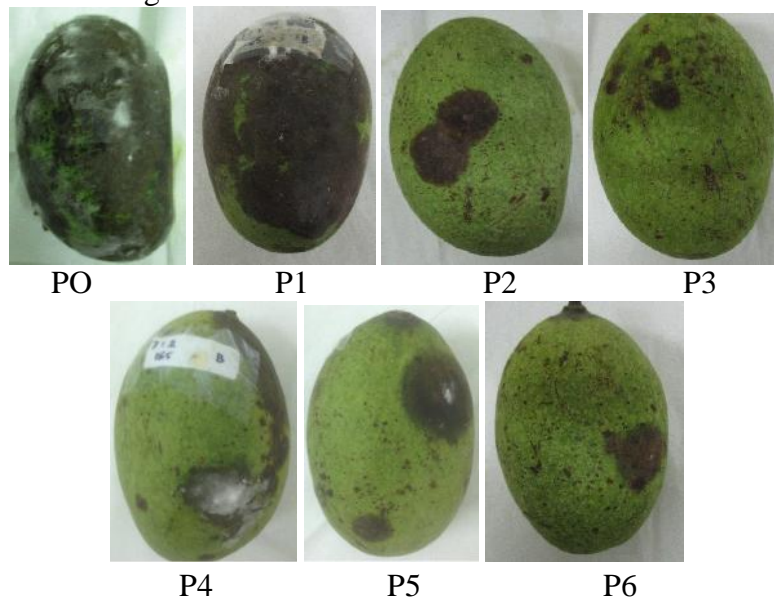
P5 = KBMR : NaTPP (5:1)

P6 = KBMR : NaTPP (5:2)

Hasil uji lanjut LSD terlihat bahwa adanya perbedaan antara P0 dan P1 berbeda nyata dengan semua perlakuan. P2 dan P5 tidak berbeda nyata satu sama lain tetapi berbeda nyata dengan P3, P4, dan P6. Hasil tersebut menguatkan kesimpulan bahwa ada pengaruh yang signifikan antara variasi perbandingan volume KBMR dan NaTPP terhadap daya hambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*.

Pumchai *et al.* (2005), menyatakan bahwa pelapisan kitosan pada mangga dapat memperpanjang umur buah-buahan karena menekan proses respirasi, transmisi dan pertumbuhan mikroba pembusuk, mengurangi penurunan berat dan kadar air. Respirasi yang rendah dapat mengakibatkan pemecahan pati termasuk gula berjalan lambat sehingga semakin rendah respirasi

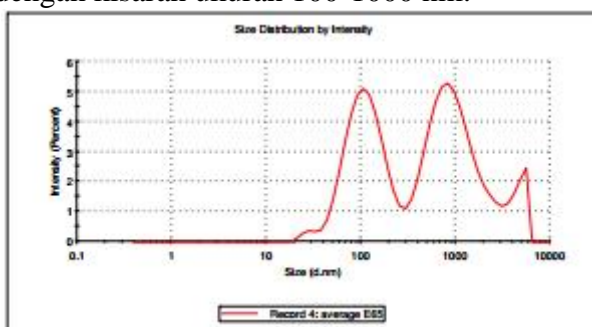
buah maka proses kematangan buah semakin lambat.



Gambar 5. Bioassay nano kitosan terhadap pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vivo* pada pengamatan hari ketujuh.

Ukuran Nano Kitosan dengan Particle Size Analyzer (PSA)

Berdasarkan hasil uji daya hambat nano kitosan terhadap jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo* didapatkan perbandingan volume KBMR dan NaTPP yang terbaik yaitu 3:1. Hasil uji PSA menunjukkan bahwa nilai rata-rata ukuran nano kitosan yaitu 228,74 nm. Mohanraj and Chen (2006), mengemukakan bahwa ukuran berorde nano dengan kisaran ukuran 100-1000 nm.



Gambar 6. Hasil pengukuran nano kitosan dengan PSA dengan perbandingan volume KBMR dan NaTPP (3:1)

Nilai indeks polidispersitas yaitu 0,884. Hal ini mengindikasikan bahwa kitosan yang terbentuk kurang stabil secara fisik, terjadi agregasi pada partikel yang menyebabkan terbentuknya partikel partikel dengan ukuran

yang lebih besar, namun karena di bawah 1 sehingga bisa diartikan tingkat keseragaman sedikit baik.

Avandi (2009), mengemukakan bahwa indeks polidispersitas memiliki *range* nilai dari 0 sampai 1. Nilai yang mendekati 0 mengindikasikan dispersi yang homogen, sedangkan nilai yang lebih besar dari 0.5 mengindikasikan heterogenitas yang tinggi.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan KBMR dari kitosan komersial hasil hidrolisis oleh *B. firmus* E65 secara enzimatik, KBMR berukuran nano yang diperoleh dengan metode *gelasi ionik* berukuran 228,74 nm, serta perbandingan volume KBMR dan NaTPP 3:1 yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan *in vivo*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis sampaikan ucapan terimakasih kepada Dr. Dra. Susiana Purwantisari, S.Si, Dr. Endang Kusdiyantini, DEA, serta Ir. Yadi

Suryadi, M.Sc atas bantuannya dalam menyelesaikan penelitian dan jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemu, K. A. Ayalew., and K. Weldetsadik. 2014. Evaluation of Antifungal Activity of Botanicals for Postharvest Management of Mango Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *J. International of Life Science*. 8 (1): 1-6.
- Avandi, M., Sadeghi, R., Mohammadpou, A.M, M., Abedin, N., Atyababi, S., Dinarvand, F., and Tehrani, R.M. 2009. Preparation and Characteritaton of Insulin Nanoparcticles using Chitosan and Arabic Gum with Ionic Gelation Method. *Nanomedicine*. 5. 58-63.
- Haliza W. and Suhartono M.T. 2012. Karakteristik Kitinase dari Mikrobia. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. 8: 1.
- Hamdayanty, Yunita, R., Amin, N.N., and Damayanti, T.A., 2012. Pemanfaatan Kitosan untuk Mengendalikan Antraknosa pada Pepaya (*Colletotrichum gloeosporioides*) dan Meningkatkan Daya Simpan Buah. *J. Fitopatologi Indonesia*. 8 (4): 97-102.
- Laili, H.N., Winarti, L., and Sari L.O.R.K. 2014. Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Naringenin dengan Variasi Rasio Massa Kitosan-Natrium Tripolifosfat (Preparation and Characterization of Naringenin-Chitosan Nanoparticles with Various Mass Ratio of Chitosan-Sodium Tripolyphosphat). *E-J. Pustaka Kesehatan*. 2 (2): 308-313.
- Mahneli, R. 2007. Pengaruh Pupuk Organik Cair dan Agensia Hayati Terhadap Pencegahan Penyakit Antraknosa *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) pada Pembibitan Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*) *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Mohanraj, V. J., and Chen Y. 2006. Nanoparticles-A review. *J. of Pharmaceut Res*. 5 (1): 561- 573.
- Pamekas, T., Sumardiyono, C., Pusposendjojo N., and Indradewa, D. 2009. Ekstraksi, Karakterisasi, dan Daya Penghambatan Kitosan Alami Terhadap Jamur *Colletotrichum musae* secara *In Vitro*. *J. Perlindungan Tanaman Indonesia*. 15 (1): 39-44.
- Pumchai S., Jitareerat, P., Kanlayanara, S., and Sangchote, S. 2005. Effect of Chitosan on Controlling of Anthracnose Disease in Mangoes cv. Nam Dok Mai. The Second Asian Conference on Plant Pathology. Integrated Meetings Specialist Pte Ltd, Singapore. 113.
- Restuati M. 2008. Perbandingan Kitosan Kulit Udang dan Kulit Kepiting dalam Menghambat Pertumbuhan Kapang *Aspergillus flavus*. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi. 582-590.
- Singh, A., and Deep, A. 2011. Formulation and Evaluation Nanoparticles Containing Losartan Potassium. *Int. J. of Pharmacy Reseach and Technology*. 17-20.
- Soesanto, L. 2004. *Ilmu Penyakit Pascapanen: Sebuah Pengantar*. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Yulia, E., and Widiyanti, F. 2007. Potensi Bakteri Antagonis Filoplen Daun Mangga dalam Menekan Penyakit Antraknosa Buah Mangga (*Mangifera indica L.*). *J. Agrikultura*. 18 (1): 53-59.