

Pengujian aktivitas antifungi kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu secara *in vitro* terhadap *Colletotrichum gloeosporioides* pada buah mangga (*Mangifera indica*)

In vitro antifungal activity assay of chitosan, nanochitosan, and nanochitosan-Cu against *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica*)

Sri WAHYUNI^{1*}, Muhammad Abdul AZIZ¹, SENTIAWATI², Deden Dewantara ERIS¹, Maria BINTANG², PRIYONO¹ & SISWANTO¹

¹Pusat Penelitian Kelapa Sawit Unit Bogor, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16128, Indonesia

²Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima tgl 22 September 2022/ Disetujui tgl 31 Oktober 2022

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides, a pathogen of anthracnose disease, can significantly reduce the quality of mango (*Mangifera indica*) fruits. Chitosan as an antifungal agent can reduce fungal growth on post-harvest agricultural products. In its development, chitosan has been widely improved through its transformation into nanochitosan and its formulation with metals. One of the metals that has a large affinity and can be formulated with chitosan is copper (Cu). This study aimed to compare and determine the optimal concentration of chitosan, nanochitosan, and nanochitosan-Cu in suppressing the growth of *C. gloeosporioides* that cause decay on mango fruits. The synthesis of nanochitosan and nanochitosan-Cu was carried out by the ionic gelation method, while the characterization was performed using particle size analyzer (PSA). The antifungal activity assay was conducted through the poisoning method by mixing 500, 750, and 1000 ppm (w/v) chitosan, nanochitosan and nanochitosan-Cu into the growth media of *C. gloeosporioides*. The results of PSA analysis showed that chitosan, nanochitosan, and nanochitosan-Cu had an average size of 606.5, 386.8, and 254.1 nm, respectively. The formulation of chitosan into nanochitosan and nanochitosan-Cu increased the fungal activity on *C. gloeosporioides* with the inhibition percentages of chitosan, nanochitosan, and nanochitosan-Cu at 750 ppm was 35%, 70%, and 100%, respectively.

[Keywords: Ionic gelation, poisoning food, copper]

Serangan cendawan penyebab antraknosa seperti *Colletotrichum gloeosporioides* dapat menurunkan kualitas buah mangga (*Mangifera indica*) secara signifikan. Kitosan sebagai agensia antifungi mampu menekan pertumbuhan cendawan pada produk pasca panen hasil pertanian. Pada perkembangannya, kitosan telah banyak dikembangkan baik melalui transformasi menjadi nanokitosan maupun formulasinya dengan logam. Salah satu logam yang memiliki afinitas besar dan dapat diformulasikan dengan kitosan adalah tembaga (Cu). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan dan menentukan konsentrasi optimal dari kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu dalam menekan pertumbuhan *C. gloeosporioides* yang menyebabkan pembusukan pada buah mangga. Sintesis nanokitosan dan nanokitosan-Cu dilakukan dengan metode gelasi ionik yang dikarakterisasi menggunakan *particle size analyzer* (PSA). Uji aktivitas antifungi dilakukan dengan metode peracunan agar dengan mencampurkan kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu pada konsentrasi 500, 750, dan 1000 ppm (b/v) pada media tumbuh isolat *C. gloeosporioides*. Hasil analisis PSA menunjukkan bahwa kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu memiliki ukuran masing-masing sebesar 606,5; 386,8; dan 254,1 nm. Selain itu, transformasi kitosan menjadi nanokitosan dan nanokitosan-Cu dapat meningkatkan aktivitas antifungi terhadap *C. gloeosporioides* dibuktikan dengan peningkatan persentase penghambatan kitosan, nanokitosan dan nanokitosan-Cu pada konsentrasi 750 ppm secara berturut-turut sebesar 35%, 70%, dan 100%.

[Kata kunci: Gelasi ionik, peracunan agar, tembaga]

Abstrak

*Penulis korespondensi: sri09wahyuni@gmail.com

Pendahuluan

Indonesia memiliki potensi sumber daya alam yang melimpah seperti buah-buahan tropis yang banyak dikonsumsi baik oleh masyarakat lokal maupun mancanegara. Buah merupakan jenis bahan pangan yang mudah mengalami kerusakan karena serangan mikroorganisme patogen mulai dari kerusakan ringan hingga menyebabkan pembusukan. Mikroorganisme pembusuk pada buah merupakan faktor utama yang memengaruhi masa simpan buah. Mikroorganisme pembusuk yang menyebabkan susut pascapanen buah secara umum adalah cendawan dan bakteri patogen.

Salah satu buah yang banyak digemari dan dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah mangga (*Mangifera indica*). Di Indonesia, mangga merupakan komoditas yang memberikan sumbangan terbesar kedua terhadap produksi buah nasional setelah pisang yaitu sebesar 2,84 jt ton pada Tahun 2021 (BPS, 2022). Masa simpan mangga tidak lebih dari 7 hari, sementara kerusakan buah paling awal disebabkan oleh serangan cendawan *Colletotrichum gloeosporioides*, salah satu penyebab penyakit antraknosa (Johansyah, 2016). Patogen tersebut mulai aktif pada saat buah memasuki fase pematangan.

Kitosan merupakan polisakarida alami turunan dari kitin yang banyak diproduksi dari kulit atau cangkang hewan kelompok *Crustaceae*. Hadrami et al. (2010) menyatakan bahwa kitosan diketahui memiliki aktivitas antifungi karena dapat menginduksi respons ketahanan tanaman terhadap infeksi cendawan patogen. Dalam perkembangannya kitosan dapat ditransformasi menjadi nanopartikel dan dikombinasikan dengan logam guna meningkatkan aktivitas antifunginya. Nanopartikel memiliki kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh koloid, memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menembus dinding sel, dan meningkatkan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Hao et al., 2017). Peningkatan stabilitas dan aktivitas dari kitosan dapat dilakukan melalui pembentukan nanopartikel kitosan yang dikompositkan dengan nanopartikel anorganik (Beyth et al., 2015). Nanopartikel kitosan dilaporkan dapat berinteraksi dengan ion logam melalui gugus amina dan hidroksil (Narayanan et al., 2020). Pang et al. (2010) dalam penelitiannya membuktikan bahwa interaksi antara nanokitosan dan tembaga (Cu) dapat meningkatkan aktivitas antifungi. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk membandingkan dan menentukan konsentrasi optimum dari kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu dalam penghambatan pertumbuhan *C. gloeosporioides* sebagai antifungi alternatif dalam mengurangi pembusukan pada buah mangga.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler serta Laboratorium Mikrobiologi Lingkungan, Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) unit Bogor. Kegiatan yang dilakukan meliputi sintesis dan karakterisasi kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu, isolasi cendawan *C. gloeosporioides* pada buah mangga, uji patogenisitas, dan uji aktivitas antifungi dengan metode peracunan agar (*food poisoned*).

Pembuatan larutan kitosan

Sejumlah 4 g kitosan ditambahkan dengan 40 mL asam asetat 2% dan ditera dengan akuades hingga 2 L. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 50°C selama 2,5 jam. Setelah kitosan larut, campuran tersebut langsung disaring menggunakan kertas saring dan disimpan pada suhu ruang (25-30°C).

Sintesis nanokitosan

Larutan kitosan (0,2%) dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* yang dilengkapi dengan *hot plate* selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 mL *Sodium Tripolyphosphate* (STPP) 1% dan dihomogenkan kembali selama 2 jam, didiamkan hingga temperatur kamar, lalu pH larutan dinaikkan hingga menjadi pH 8–10 dengan tujuan untuk pembentukan nanopartikel. Setelah itu, pH dinetralkan kembali melalui pencucian beberapa kali dengan akuades hingga mencapai pH 6–7. Partikel yang terbentuk kemudian disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, dimasukkan ke dalam *deep freezer* -80°C hingga beku, kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* pada temperatur 3-5°C untuk memperoleh serbuk nanokitosan (Chowdappa et al., 2014; Saharan et al. 2015).

Sintesis nanokitosan-Cu

Metode sintesis nanokitosan-Cu mengacu pada Arora et al. (2019) dengan modifikasi konsentrasi STPP, ratio NaOH/CuSO₄ dan suhu *freeze dryer*. Larutan kitosan (0,2%) dihomogenkan menggunakan bantuan *magnetic stirrer* yang dilengkapi dengan *hot plate* selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,5 mL STPP 1%. Campuran NaOH 1 M dan CuSO₄ 100 µM dengan rasio 1:10 (v/v) ditambahkan ke dalam larutan kitosan-STPP dan dihomogenkan selama 12 jam, kemudian didiamkan hingga temperatur kamar. Selanjutnya larutan ditepatkan pada kisaran pH 8–10 untuk pembentukan nanopartikel. pH dinetralkan kembali melalui pencucian beberapa kali dengan akuades hingga mencapai pH 6-7. Partikel yang terbentuk kemudian disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, kemudian dimasukkan ke dalam *deep freezer* -80°C hingga beku. Setelah itu,

dikeringkan menggunakan *freeze dryer* pada temperatur 3-5°C untuk memperoleh serbuk nanokitosan-Cu.

Karakterisasi distribusi ukuran partikel

Analisis distribusi ukuran partikel dilakukan menggunakan instrumen *particle size analyzer* (PSA) di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor. Sebanyak 0,1 g endapan kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu dilarutkan dengan 5 mL etanol, kemudian disonikasi selama 15 menit. Analisis distribusi ukuran partikel dilakukan dengan menempatkan larutan ke dalam *portable kuvet*, kemudian dimasukkan ke dalam instrumen PSA. Hasil pembacaan ditampilkan dalam bentuk grafik yang menggambarkan sebaran ukuran partikel dari ukuran terkecil hingga terbesar serta ukuran rata-rata berdasarkan intensitas yang dihasilkan (Sari *et al.*, 2017).

Isolasi cendawan *C. gloeosporioides* dari buah mangga

Buah mangga yang digunakan adalah jenis arum manis yang dipanen dari pohon dua hari sebelum pengujian. Mangga yang terserang antraknosa dicuci dengan air mengalir, kemudian pada bagian kulit buah yang terserang dipotong dengan ukuran 1 x 2 cm menggunakan pisau steril. Potongan kulit mangga direndam dalam larutan alkohol 70% selama 3 menit, selanjutnya dibersihkan dengan larutan Sodium Hipoklorit (NaOCl) 1% selama 5 menit, lalu dikeringkan dengan tisu steril dan dicuci kembali dengan alkohol 70% selama 30 detik, diikuti dengan akuades steril sebanyak 3 kali (Barnett & Hunter, 1998). Potongan kulit mangga selanjutnya diletakkan dalam cawan yang berisi media *potato dextrose agar* (PDA) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 minggu. Kultur murni isolat cendawan diidentifikasi secara mikroskopis dengan melihat bentuk hifa dan konidia menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400x. Identifikasi cendawan patogen dilakukan dengan mengacu pada kunci identifikasi Barnett & Hunter (1998).

Patogenisitas isolat cendawan patogen dari buah mangga yang ditumbuhkan pada medium PDA, diinokulasikan kembali pada mangga yang sehat. Buah mangga dilukai menggunakan pisau pada ukuran ±1,5 cm. Miselium *C. gloeosporioides* beserta mediana diinokulasikan ke dalam sayatan kulit mangga, sedangkan media PDA tanpa diinokulasi dijadikan sebagai kontrol. Mangga yang telah diinokulasi kemudian ditutup menggunakan plastik *wrap*, diinkubasi pada suhu ruang, dan diamati setiap 3 hari selama 12 hari. Gejala yang timbul dari pertumbuhan

C. gloeosporioides ditandai dengan terbentuknya bercak coklat kehitaman yang melingkar pada kulit buah mangga.

Uji aktivitas antifungi dengan metode peracunan agar

Metode *peracunan agar* dilakukan dengan menambahkan senyawa antifungi pada media PDA. Senyawa antifungi yang diuji adalah kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu dengan konsentrasi 500, 750, dan 1000 ppm (5 ulangan). Media dengan tambahan aquades digunakan sebagai kontrol negatif, sementara media dengan tambahan fungisida *Dithane 0,3%* (bahan aktif Mankozebe 80%) digunakan sebagai kontrol positif. Sebanyak 9 mL media PDA cair dituangkan ke dalam cawan Petri, lalu ditambahkan senyawa antifungi sebanyak 1 mL pada masing-masing konsentrasi, kemudian dihomogenkan dengan cara diputar-putar secara orbital. Setelah media siap digunakan, cendawan *C. gloeosporioides* dengan diameter 1 cm (umur 14 hari) diinokulasikan secara aseptis pada bagian tengah cawan Petri, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama enam hari (Mishra *et al.*, 2014). Diameter koloni cendawan yang tumbuh diamati pada hari ke tujuh dengan menarik garis diameter horizontal, vertikal dan diagonal. Persentase penghambatan dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{c-T}{c} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

c = diameter koloni pada kontrol negatif

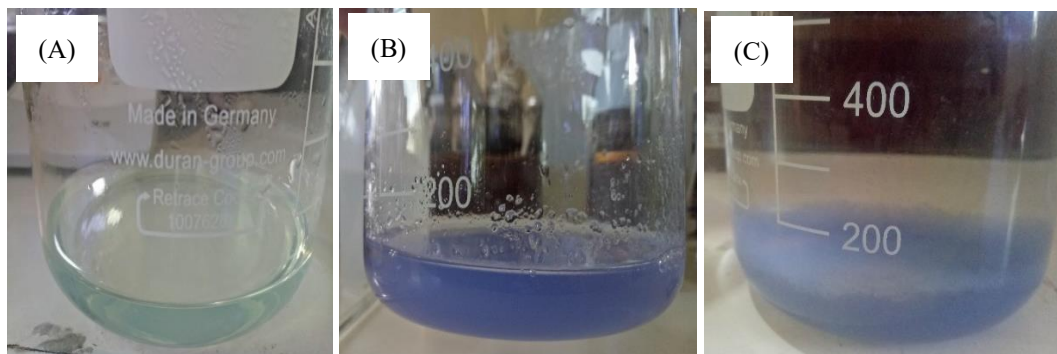
T = diameter koloni pada larutan uji

Data hasil penelitian berupa persentase penghambatan diperoleh melalui analisis statistik dengan menggunakan uji Anova (Uji F) pada taraf uji 5%. Uji lanjut (*posthoc*) dilakukan dengan Uji Tukey pada $\alpha = 5\%$.

Hasil dan Pembahasan

Sintesis dan karakterisasi nanokitosan dan nanokitosan-Cu

Keberhasilan sintesis nanokitosan-Cu berdasarkan perubahan fisik larutan dengan mengamati perubahan warna yang melibatkan pH dan suhu (Wahyuni *et al.*, 2020). Perubahan warna menjadi putih pekat menunjukkan adanya reaksi reduksi. Campuran CuSO₄ dan kitosan dengan pH 3 menunjukkan warna biru muda bening. Perubahan warna terjadi saat proses *adjustment* pH menjadi basa pada pH 10 (Gambar 1). Pada kondisi basa terjadi perubahan visual larutan menjadi biru tua yang disertai dengan pembentukan partikel berukuran nano. Hal ini sesuai dengan penelitian



Gambar 1. Proses pembentukan partikel nanokitosan-Cu. (A) Nanokitosan-Cu pada pH 3, (B) pembentukan partikel pada pH 10, dan (C) pemisahan partikel dengan pencucian

Figure 1. The formulation process of nanochitosan-Cu particles. (A) Nanochitosan-Cu at pH 3, (B) particle formulation at pH 10, and (C) particle separation by washing

sebelumnya, salah satu keberhasilan dari biosintesis nanopartikel kitosan-Cu adalah perubahan warna menjadi biru keunguan yang menunjukkan adanya reaksi reduksi pada campuran tersebut (Prasetyo, 2018). Kitosan mampu mereduksi logam Cu^{+} menjadi Cu^{0} . Muatan negatif Cu dalam larutan $CuSO_4$ yang ditambahkan akan mengalami *crosslinking* dengan muatan positif kitosan. Interaksi antar partikel bermuatan tersebut dapat menghasilkan kompleks polielektrolit berukuran nano. Keberhasilan terbentuknya nanopartikel ditandai oleh perubahan warna dan terbentuknya titik-titik partikel yang akan mengendap setelah pencucian dan inkubasi beberapa saat pada suhu ruang (Gambar 1C).

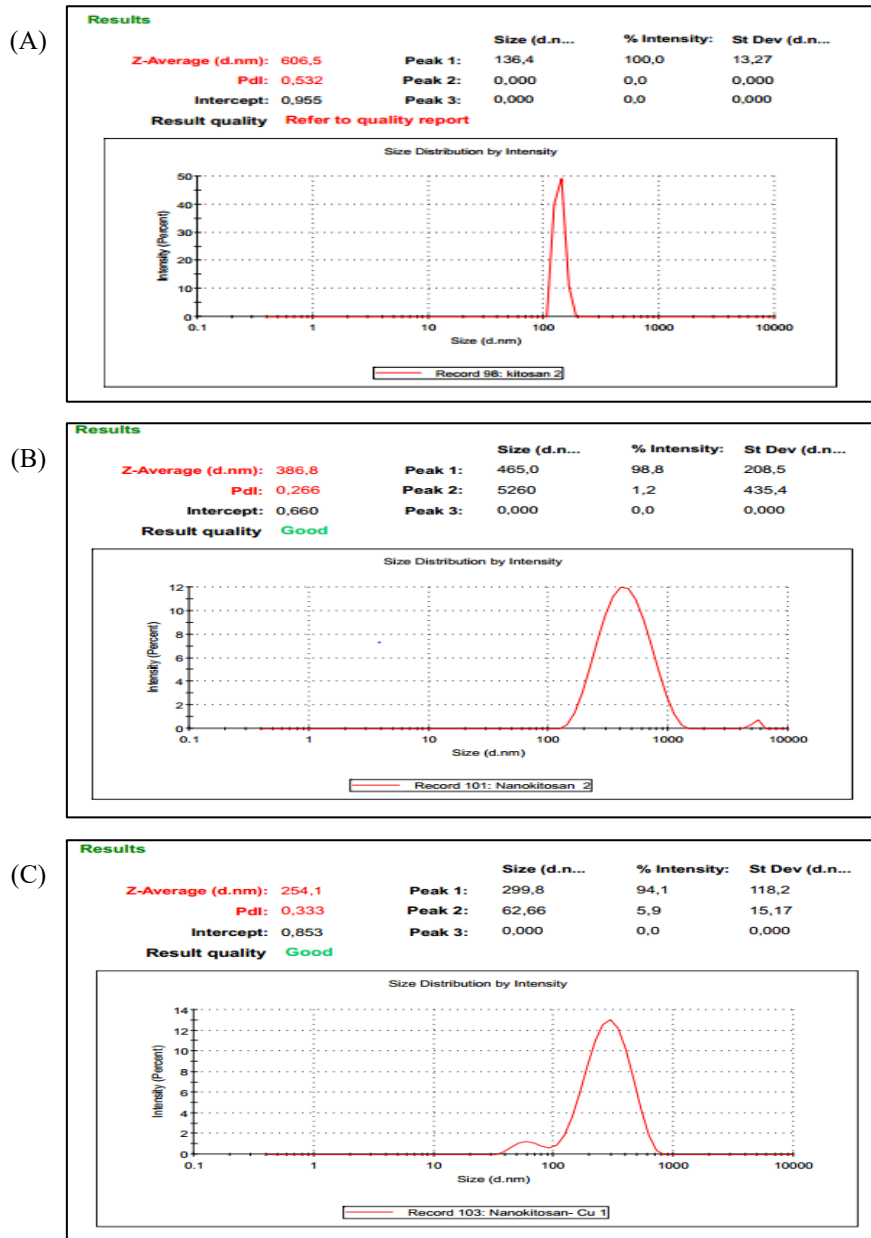
Karakterisasi kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu dilakukan dengan menganalisis distribusi ukuran partikel menggunakan alat PSA *Zeta Nanosizer* dengan prinsip gerak Brownian. Hasil uji PSA pada kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu menunjukkan ukuran diameter partikel yang beragam (Gambar 2). Kitosan menunjukkan distribusi ukuran partikel 0-136,4 nm dengan rerata diameter partikel sekitar 606,5 nm. Berdasarkan pengamatan PSA, partikel dengan diameter 0 nm muncul pada *peak* 3 dengan intensitas sebesar 0% dan *peak* 1 dengan diameter 136,4 nm dengan intensitas 100%. Sementara itu, pada *peak* ke 2 teramati diameter 0 nm dengan intensitas 0% dan *intercept* 0,955. Nanokitosan menunjukkan distribusi ukuran partikel 0-464,0 nm dengan rata-rata diameter partikel sebesar 386,8 nm. Jika dilakukan pengamatan pada setiap pengukuran, partikel dengan diameter 0 nm muncul pada *peak* 3 dengan intensitas sebesar 0% dan *peak* 2 dengan diameter sekitar 5260 nm dengan intensitas 1,2%. Nanokitosan-Cu menunjukkan distribusi ukuran partikel 0-299,8 nm dengan rata-rata diameter partikel sebesar 254,1 nm. Berdasarkan pengamatan pada setiap pengukuran, partikel dengan diameter

0 nm muncul pada *peak* 3 dengan intensitas sebesar 0% dan *peak* 2 dengan diameter 62,66 nm dengan intensitas 5,9%. Sementara itu, pada *peak* ke-1 memiliki diameter 299,8 nm dengan intensitas 94,1% dan *intercept* 0,853. Hal Ini membuktikan bahwa ukuran partikel nanokitosan-Cu < nanokitosan < kitosan yang mana ukuran partikel sangat memengaruhi aktivitas antifungi dari kitosan (Husniati, 2014).

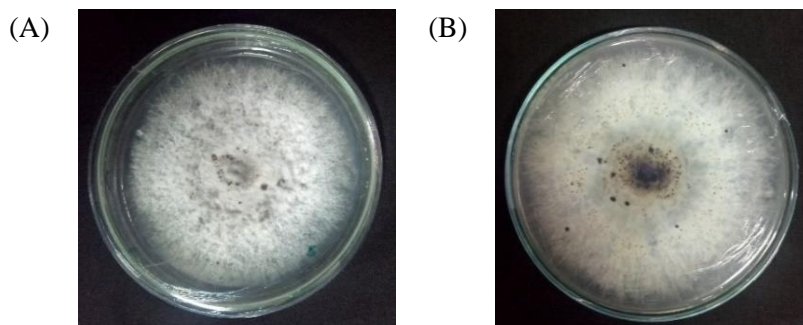
Berdasarkan nilai PDI, distribusi ukuran nanokitosan dan nanokitosan-Cu menunjukkan ukuran partikel yang seragam, sedangkan kitosan menunjukkan ukuran partikel yang heterogen. Nilai PDI merupakan nilai kuadrat dari deviasi standar dibagi dengan diameter partikel rata-rata. Nilai PDI antara 0,1 dan 0,25 menunjukkan partikel *monodisperse*, sedangkan nilai $PDI > 0,5$ menunjukkan distribusi ukuran partikel *polydisperse*. Adapun nilai polidispersitas yang paling baik adalah $< 0,3$ (Badran, 2014; Cooper et al., 2014; Raval et al., 2018).

Isolasi, identifikasi dan reisolasi cendawan *C. gloeosporioides*

Hasil identifikasi secara makroskopis menunjukkan bahwa cendawan *C. gloeosporioides* pada media PDA menghasilkan miselium dengan koloni berwarna putih abu-abu dan bagian belakang koloni berwarna coklat kehitaman (Gambar 3B) serta menunjukkan pertumbuhan yang lambat (3-6 mm dalam 24 jam), sementara pertumbuhan cendawan terlihat jelas setelah 7 hari inkubasi. Hialin berwarna merah muda, sementara aservulus hanya ada pada jaringan yang terinfeksi. Miselium tidak berwarna kemudian berubah menjadi gelap pada kultur yang sudah tua (lebih dari 15 hari) dan muncul noda-noda hitam pada permukaan koloni (Gambar 3). Hasil isolasi cendawan *C. gloeosporioides* diremajakan ulang pada media PDA baru.



Gambar 2. Distribusi ukuran partikel kitosan (A), nanokitosan (B), dan nanokitosan-Cu (C)
 Figure 2. Particle size distribution of chitosan (A), nanochitosan (B), and nanochitosan-Cu (C)



Gambar 3. Isolat *C. gloeosporioides* tampak depan (A) dan tampak belakang (B). Skala garis= 2 cm
 Figure 3. *C. gloeosporioides* isolate at the front (A) and back (B) parts. Bar= 2 cm

Pengamatan uji patogenitas cendawan *C. gloeosporioides* pada buah mangga menunjukkan bahwa pada hari ke-3 mangga kontrol belum mengalami pembusukan yang ditandai dengan tidak munculnya bercak hitam pada kulit buah, sedangkan mangga yang diberi perlakuan terlihat berwarna kehitaman di sekeliling pelukaan yang mulai menyebar dan terlihat kematian jaringan pada mangga yang ditandai dengan menghitamnya kulit mangga. Pada hari ke-3 hingga ke-12 mangga yang diberi perlakuan mengalami kerusakan jaringan yang lebih luas daripada mangga kontrol (Gambar 4).

Pertumbuhan cendawan *C. gloeosporioides* pada buah mangga ditandai dengan meluasnya kerusakan jaringan buah yang terus berkembang menjadi kehitaman seiring bertambahnya waktu inkubasi hingga 12 hari. Cendawan *C. gloeosporioides* dapat tumbuh dengan baik pada buah mangga dengan memanfaatkan sumber karbohidrat pada buah, yang didukung dengan suasana lembab yang sesuai dengan syarat tumbuh cendawan tersebut. Kerusakan jaringan buah ini akan menyebabkan busuk buah secara keseluruhan. Berdasarkan hasil pengamatan, gejala nekrotik

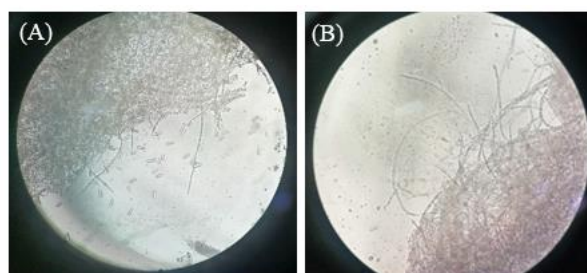
berwarna coklat hingga hitam pada kulit mangga mulai muncul 2-4 hari setelah penetrasi spora. Di dalam jaringan yang terinfeksi, cendawan berkembang dengan cepat kemudian bertahan dalam bentuk konidium, hifa, dan sklerotium (Gambar 4).

Timbulnya bercak hitam pada kulit mangga yang telah mengalami kematian jaringan diamati dengan mikroskop cahaya. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bentuk konidia yang silindris dengan ujung yang tumpul. Cendawan *C. gloeosporioides* memiliki bentuk konidia silindris dengan ujung spora yang tumpul, berukuran spora sekitar 16,1x5,6 µm. Konidia transparan dan memanjang antara 10-16 µm dengan lebar 5-7 µm (Gambar 5), bentuk hifa bersekat-sekat dan bercabang. Hasil pengamatan mikroskopis dari uji patogenitas menunjukkan hasil yang sama dengan mikroskopis awal, sehingga cendawan yang digunakan terkonfirmasi merupakan *C. gloeosporioides*. Setelah hasil uji secara mikroskopis sesuai, hasil uji patogenitas dilanjutkan dengan menumbuhkan kembali pada media PDA (re-isolasi).



Gambar 4. Hasil pengamatan uji patogenitas pada buah mangga yang terinfeksi cendawan *C. gloeosporioides* (kanan) dan kontrol (kiri). Skala baris= 5 cm

Figure 4. The observation of pathogenicity test assay in mango fruit infected by *C. gloeosporioides* isolate (right) and control (left). Bar= 5 cm



Gambar 5. Kenampakan mikroskopis konidia (A) dan hifa (B) cendawan *C. gloeosporioides* pada perbesaran 400 kali

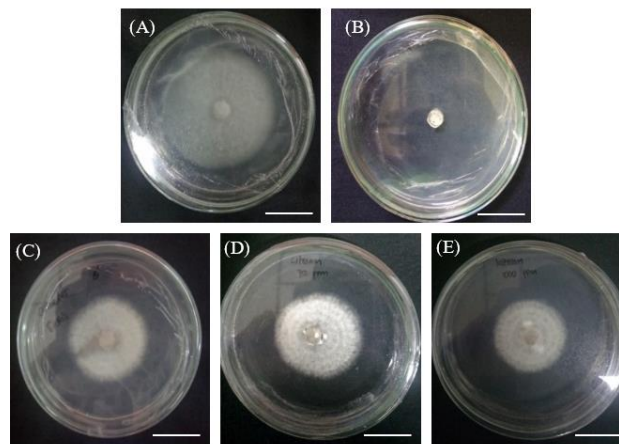
Figure 5. Microscopic appearance of conidia (A) and hyphae (B) of *C. gloeosporioides* at 400 times magnification

Pertumbuhan cendawan hasil re-isolasi pada buah mangga menunjukkan identitas dan ciri pertumbuhan hifa yang identik dengan hasil isolat awal cendawan *C. gloeosporioides* yang langsung diisolasi dari buah mangga terserang antraknosa. Pertumbuhan hifa ke samping terlihat dengan jelas setelah hari ke tujuh inokulasi (Gambar 5).

Uji aktivitas antifungi dengan metode peracunan agar

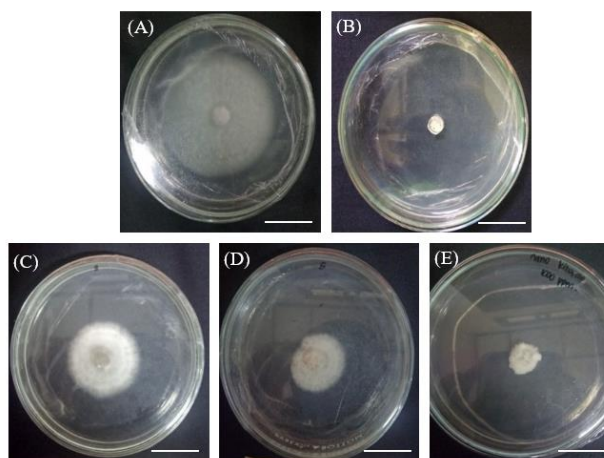
Berdasarkan hasil penelitian, larutan kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu memberikan efek penghambatan pertumbuhan cendawan hampir pada semua konsentrasi yang diujikan. Perlakuan kitosan pada konsentrasi 500, 750, dan 1000 ppm menghasilkan persentase penghambatan terhadap *C. gloeosporioides* masing-masing sebesar 11%,

34% dan 35% dibandingkan kontrol negatif (Gambar 6). Nanokitosan pada konsentrasi 500 ppm mampu menghambat pertumbuhan cendawan *C. gloeosporioides* sebesar 46%, sementara pada konsentrasi 750 dan 1000 ppm masing-masing sebesar 70% dan 72% (Gambar 7). Perlakuan nanokitosan-Cu memberikan aktivitas antifungi terbaik pada konsentrasi 1000 dan 750 ppm yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan cendawan *C. gloeosporioides* (Gambar 8). Hal ini menunjukkan bahwa nanokitosan-Cu pada konsentrasi 750 ppm sudah mampu menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* hingga 100%, sedangkan pada konsentrasi 500 ppm mampu menghambat pertumbuhan cendawan sebesar 49%. Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa



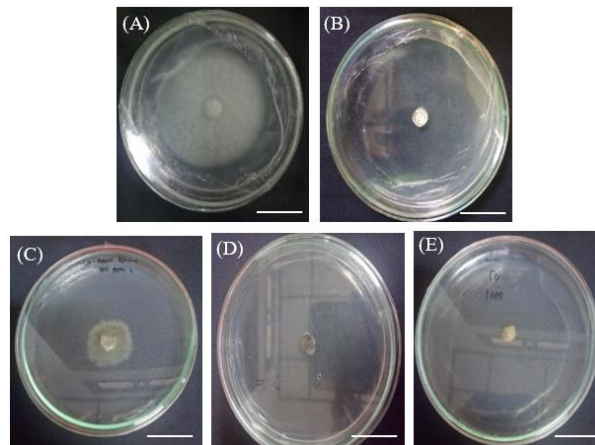
Gambar 6. Diameter miselium *C. gloeosporioides* pada umur 7 hari: kontrol negatif (A), kontrol positif (B), kitosan 500 ppm (C), kitosan 750 ppm (D), dan kitosan 1000 ppm (E). Skala garis= 2 cm

Figure 6. Mycelium diameter of *C. gloeosporioides* after 7 days: negative control (A), positive control (B), chitosan 500 ppm (C), chitosan 750 ppm (D), and chitosan 1000 ppm (E). Bar= 2 cm



Gambar 7. Diameter miselium *C. gloeosporioides* pada umur 7 hari: kontrol negatif (A), kontrol positif (B), nanokitosan 500 ppm (C), nanokitosan 750 ppm (D), dan nanokitosan 1000 ppm (E). Skala garis= 2 cm.

Figure 7. Mycelium diameter of *C. gloeosporioides* after 7 days: control (A), positive control (B), nanochitosan 500 ppm (C), nanochitosan 750 ppm (D), and nanochitosan 1000 ppm (E). Bar= 2 cm.



Gambar 8. Diameter miselium *C. gloeosporioides* pada umur 7 hari: kontrol negatif (A), kontrol positif (B), nanokitosan-Cu 500 ppm (C), nanokitosan-Cu 750 ppm (D), dan nanokitosa-Cu 1000 ppm (E). Skala garis= 2 cm

Figure 8. Mycelium diameter of *C. gloeosporioides* after 7 days: control (A), positive control (B), nanochitosan-Cu 500 ppm (C), nanochitosan-Cu 750 ppm (D), and nanochitosan-Cu 1000 ppm (E). Bar= 2 cm

pengembangan formulasi kitosan menjadi nanokitosan dan nanokitosan-Cu terbukti dapat meningkatkan aktivitas antifungi kitosan terhadap infeksi cendawan *C. gloeosporioides* pada buah mangga.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa seluruh perlakuan baik kitosan, nanokitosan, maupun nanokitosan-Cu secara signifikan memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik dibandingkan kontrol negatif, sedangkan perlakuan nanokitosan 750 dan 1000 ppm tidak berbeda nyata dengan kontrol positif dengan hasil penghambatan yang sama besar (Tabel 1). Konsentrasi Nanokitosan-Cu 750 ppm ini menunjukkan konsentrasi yang jauh lebih kecil dibandingkan kontrol positif 0,3% (3000 ppm), sehingga dosis yang digunakan lebih kecil dalam aplikasinya dibandingkan dosis penggunaan fungisida berbahan aktif mankozeb yang umum digunakan.

Berdasarkan Tabel 1, konsentrasi larutan (kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu) berbanding lurus dengan persentase penghambatan. Semakin besar konsentrasi larutan antifungi yang digunakan, maka semakin besar pula persentase penghambatan terhadap pertumbuhan cendawan *C. gloeosporioides*. Sudjarwo et al. (2019) menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan akan meningkatkan aktivitas antifungi. Konsentrasi senyawa antifungi yang tinggi berkorelasi positif terhadap aktivitas penghambatan pertumbuhan cendawan patogen. Sitepu et al. (2012) menambahkan bahwa semakin meningkat dosis komposit kitosan yang ditambahkan dalam

media pertumbuhan cendawan, jumlah larutan yang berhasil terdifusi ke dalam sel cendawan semakin tinggi. Hal ini menyebabkan pertumbuhan cendawan terganggu hingga menyebabkan kematian pada cendawan tersebut.

Kemampuan kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu dalam menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* disebabkan oleh kandungan kitosan yang dapat mengganggu permeabilitas sel hingga menyebabkan kematian sel. Mekanisme penghambatan pertumbuhan *C. gloeosporioides* melibatkan interaksi gugus aktif kitosan dengan reseptor pada membran sel. Polikation yang ada pada kitosan berikatan melalui interaksi elektrostatis dengan muatan negatif dari membran sel sehingga memengaruhi permeabilitas dan menyebabkan kebocoran bahan intraseluler seperti enzim, protein, materi genetik, dan lain-lain (Hernandez-Lauzardo et al., 2011; Lopez-moya et al., 2019).

Pada konsentrasi 750 ppm, nanokitosan memperlihatkan peningkatan daya penghambatan 2 kali lipat dibandingkan kitosan yaitu dari 34% menjadi 70%. Oleh sebab itu, transformasi kitosan menjadi nanokitosan terbukti mampu meningkatkan aktivitas antifungi terhadap *C. gloeosporioides*. Partikel berukuran nano memiliki kontak permukaan yang lebih besar dibandingkan partikel yang sama dengan ukuran yang lebih besar. Hal ini membuat nanopartikel bersifat lebih reaktif, sehingga aktivitas antifungi dan antibakteri semakin meningkat (Kammona & Kiparissides, 2012; Kumowal et al., 2019).

Tabel 1. Diameter miselium dan persentase penghambatan *C. gloeosporioides* pada pengujian agensia antifungi kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu pada hari ke 7Table 1. Mycelium diameter and inhibition percentage of *C. gloeosporioides* in the chitosan, nanochitosan, and nanochitosan-Cu antifungal agent assay on days 7

Perlakuan <i>Treatment</i>	Diameter miselium (cm) <i>Mycelium diameter (cm)</i>	Persentase penghambatan (%) <i>Percentage of inhibition (%)</i>
Kontrol negatif	2,97 e	-
Kontrol positif	0,00 a	100,00
Kitosan 1000 ppm	1,97 d	35,19
Kitosan 750 ppm	1,92 d	33,67
Kitosan 500 ppm	2,64 e	11,11
Nanokitosan 1000 ppm	0,82 b	72,22
Nanokitosan 750 ppm	0,90 bc	69,53
Nanokitosan 500 ppm	1,59 d	46,34
Nanokitosan-Cu 1000 ppm	0,00 a	100,00
Nanokitosan-Cu 750 ppm	0,00 a	100,00
Nanokitosan-Cu 500 ppm	1,50 cd	49,49

*notasi huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan

*the different letter in the same column defines the significant difference result

Pada konsentrasi 750 ppm, nanokitosan-Cu juga memperlihatkan peningkatan daya penghambatan sebesar 30% dibandingkan nanokitosan yaitu dari 70% menjadi 100%. Dengan adanya penambahan logam Cu dalam komposit nanokitosan terbukti dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dibandingkan nanokitosan tanpa penambahan logam (Chowdappa *et al.*, 2014; Choudhary *et al.*, 2017). Logam Cu memiliki aktivitas antifungi, sehingga penambahan logam Cu mampu meningkatkan aktivitas antifungi pada nanokitosan. Selain itu, logam Cu sering digunakan dalam nanopartikel karena selain kemampuan aktivitas antifunginya, logam Cu terbukti *non-toxic* baik pada lingkungan maupun tumbuhan, hal tersebut terbukti dengan tidak adanya efek negatif pada pertumbuhan tanaman (Saharan *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2017). Eris *et al.* (2019) menambahkan bahwa aktivitas antimikroba nanokitosan-Cu dapat menyebabkan perubahan morfologis (malformasi struktur hifa) dan ultra struktur *C. capsici* yang ditandai dengan hifa yang menggembung atau menggada. Penelitian ini menunjukkan potensi yang menjanjikan dalam peningkatan aktivitas kitosan menjadi nanokitosan dan nanokitosan-Cu untuk perlindungan buah mangga dari serangan penyakit antraknos, sehingga perlu dilakukan validasi melalui penelitian lanjutan dalam skala rumah kaca dan lapang.

Mori *et al.* (1995) menggolongkan persen penghambatan antifungi menjadi 4 kategori yaitu sangat kuat (>75%), kuat (50-75%), sedang (25-

50%), lemah (0-25%), dan tidak aktif (0%). Berdasarkan penggolongan tersebut maka nanokitosan-Cu pada konsentrasi 750 dan 1000 ppm memiliki persentase penghambatan sangat kuat, sedangkan nanokitosan 750 dan 1000 ppm memiliki persentase penghambatan kuat dan sedang. Kitosan 750 dan 1000 ppm, Nanokitosan, dan Nanokitosan-Cu pada 500 ppm serta Nanokitosan-Cu 500 ppm memiliki persentase penghambatan sedang.

Kesimpulan

Kitosan dapat diformulasi menjadi nanokitosan dan nanokitosan-Cu dan terbukti memiliki aktivitas antifungi terhadap cendawan *C. gloeosporioides* yang lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan. Ukuran partikel dan konsentrasi yang digunakan berpengaruh nyata terhadap penghambatan pertumbuhan *C. gloeosporioides*. Kitosan, nanokitosan, dan nanokitosan-Cu pada konsentrasi 750 ppm (0,075%) mampu menghambat pertumbuhan *C. gloeosporioides* masing-masing sebesar 34%, 70%, dan 100%.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh APBN Kementerian Pertanian melalui program kerjasama Penelitian, Pengkajian dan Pengembangan Pertanian Strategis (KP4S) tahun 2018 dengan nomer kontrak 31.44/PL.040/H.1/02/2018.K tanggal 12 Februari 2018.

Daftar Pustaka

- Arora D, V Dhanwal, D Nayak, A Saneja, H Amin, RU Rasool, PN Gupta and A Goswarni (2016). Preparation, characterization and toxicological investigation of copper loaded chitosan nanoparticles in human embryonic kidney HEK-293 cells. *J. Materials Sci and Eng* 6(1), 227 – 234.
- Badan Pusat Statistik (BPS) (2022). Produksi tanaman buah-buahan 2021. <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/1/produksi-tanaman-buah-buahan.html>. [diakses pada 6 Oktober 2022]
- Badran M (2014). Formulation and In Vitro Evaluation of Flufenamic Acid Loaded Deformable Liposomes for Improved Skin Delivery. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9(1), 83–91.
- Barnett HL & BB Hunter (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company, Mineapolis.
- Beyth N, Y Hourri-Haddad, A Domb, W Khan & R Hazan (2015). Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 1-16.
- Choudhary RC, RV Kumaraswamy, S Kumari, A Pal, R Raliya, P Biswas & V Saharan (2017). Synthesis, characterization, and application of chitosan nanomaterials loaded with zinc and copper for plant growth and protection. *Nanotechnology* 10, 227-247.
- Chowdappa P, S Gowda, CS Chethana & S Madhura (2014). Antifungal activity of chitosan-silver nanoparticle composite against *Colletotrichum gloeosporioides* associated with mango anthracnose. *African Journal of Microbiology Research* 8(17), 1803 – 1812.
- Cooper DL, CM Conder, S Harirforoosh (2014). Nanoparticles in Drug Delivery: Mechanism of Action, Formulation and Clinical Application towards Reduction in Drug-associated Nephrotoxicity. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(10), 1661–1680.
- Eris DD, S Wahyuni, SM Putra, CA Yusup, AS Mulyatni, Siswanto, EH Krestini & C Winarti (2019). Pengaruh nanokitosan-Ag/Cu pada perkembangan penyakit antraknosa pada cabai. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 24(3), 201-208.
- Hadrami AE, LR Adam, IE Hadrami dan F Daayf (2010). Chtosan in Plant Protection. *J Marine Drugs*,8(4): 968-998.
- Hao J, B Guo, S Yu, W Zhang, D Zhang & Y Wang (2017). Encapsulation Of The Flavonoid Quercetin With Chitosan-Coated NanoLiposomes. *LWT-Food Science and Technology*. 85, 37-44.
- Hernandez-Lauzardo AN, GV Miguel & GG Maria (2011). Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *African Journal of Microbiology Research* 5(25), 4243-4247.
- Husniati EO (2014). Sintesis Nanopartikel Kitosan dan Pengaruhnya terhadap Inhibisi Bakteri pembusuk jus nenas. *Jurnal Dinamika Penelitian Industri* 25(2), 89-95.
- Johansyah M (2016). Pengendalian penyakit antraknosa pada buah 143anga arum manis (*Mangifera indica* L) dengan menggunakan perlakuan air panas dan lilin lebah. *Skripsi*. Fakultas Pertanian-Peternakan, Universitas Muhamadiyah-Malang.
- Kammona O & C Kiparissides (2012). A Review: Recent Advances in Nanocarrier-based Mucosal Delivery of Biomolecules. *J Controlled Release* 161(3), 781-794.
- Kumowal S, Fatimawali & I Jayanto (2019). Uji aktivitas antibakteri nanopartikel ekstrak lengkuas putih (*Alpinia galanga* (L.) Willd) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi* 8(4), 263-272.
- Lopez-moya F, M Suarez-Fernandes & LV Lopez-Liorca (2019). Molecular mechanisms of chitosan Interaction with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2), 332.
- Mishra P, P Singh & NN Tripathi (2014). Evaluation plant extracts against *Fusarium oxysporum* F. SP. *Lycopersici*, wilt patoghren of tomato. *J. Food, Agric and Veter Sci* 4(2), 163 – 167.
- Mori M, M Aoyama, S Doi, A Kanethosi & T Hayashi (1997). Antifungal activity of bark extracts of deciduous trees. *Holz als Roh und Werkstoff* (55), 130-132.
- Narayanan VS, PV Prasath, K Ravichandran, D Easwaramoorthy, Z Shahnavaz, F Mohammad, HA Al-Lohedan, S Paiman, WC Oh & S Sagadevan (2020). Schiff-base derived chitosan impregnated copper oxide

- nanoparticles: An effective photocatalyst in direct sunlight. *Materials Science in Semiconductor Processing* 119, 105238.
- Pang R, Y Wang, Y Zhang & T Tsah (2010). *Colletotrichum gloeosporoides* association with *Theobroma cacao* and other plants in Panama. *J. Mycologia* 102(6), 1318-1338.
- Prasetyo MA (2018). Sintesis nanopartikel kitosan-Cu dan uji penghambat *Fusarium oxysporum* penyebab penyakit layu daun pada tanaman cabai (*Capsicum sp.*) (Skripsi). Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Raval N, R Maheshwari, D Kalyane, SR Youngren-Ortiz, MB Chougule, RK Tekade (2019). Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development, *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, 369-400. doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8.
- Saharan V, G Sharma, M Yadav, M Choudary, S Sharma, A Pal, R Raliya & P Biswas (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-Chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *J. Bio Macromol* 75, 346-353.
- Sari RN, Nurhasni & MA Yaqin (2017). Sintesis nanopartikel ZnO ekstrak *Sargassum sp.* dan karakterisasi produknya. *JPHPI* 20(2), 238-254.
- Sitepu I, L Ignatia, A Franz, D Wong, S Faulina, M Tsui, A Kanti & K Boundy (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J Microbiol Methods* 91(2), 321-328.
- Sudjarwo GW, MS Rosalia & Mahmiah (2019). Uji aktivitas antijamur nanopartikel kitosan terhadap jamur *Candida albicans* secara in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan XIV*. Universitas Hang Tuah, 22 Juli 2019, Surabaya.
- Wahyuni S, MA Prasetyo, DD Eris, Siswanto & Priyono (2020). Sintesis dan uji in vitro penghambatan nanokitosan-Cu terhadap pertumbuhan *Fusarium oxysporum* dan *Colletotrichum capsica*. *Menara Perkebunan* 88(1), 52-60.