

Waktu Inkubasi pada Derajat Distilasi Kitosan Enzim dan Efektifitas Penghambatannya terhadap Penyakit Antraknosa

Incubation Time on the Degree Deacetylation of Enzymatic Chitosan and Its Effectiveness on the Inhibition of Anthracnose Disease

Yadi Suryadi^{1*}, Tri Puji Priyatno¹, I Made Samudra¹, Dwi Ningsih Susilowati¹,
Hermawati Nurzulaika², Syaefudin²

¹Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor 16111

²Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Salah satu alternatif untuk pengendalian penyakit antraknosa yang disebabkan oleh *Colletotrichum* sp. pada buah-buahan, yaitu menggunakan kitosan sebagai pelapis permukaan saat pascapanen. Penelitian ini bertujuan mendapatkan produksi optimal kitosan yang dihidrolisis secara enzimatik (KE) menggunakan kitinase asal *Burkholderia cepacia* isolat E76 sebagai bahan anticendawan untuk mengendalikan antraknosa. Waktu inkubasi terbaik untuk menghasilkan KE ialah 2 jam dengan hasil 3.52 ± 0.38 g. Nilai derajat distilasi (DD) kitosan dan KE diperoleh masing-masing sebesar 66.91% dan 80.91%. Uji *in vitro* menunjukkan bahwa KE 2% efektif menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. dengan penghambatan sebesar 94.22%, sedangkan kitosan 3% menekan patogen dengan penghambatan sebesar 55.26%. Perlakuan KE 2%, menekan perkecambahan konidium paling tinggi sebesar 74.12%. Uji *in vivo* KE 2% menunjukkan penghambatan tertinggi terhadap *Colletotrichum* sp. pada pepaya sebesar 88.88%, sedangkan pada cabai menunjukkan penghambatan terbaik sebesar 55.55% masing-masing pada konsentrasi KE 2% dan 3%.

Kata kunci: Cabai, *Colletotrichum* sp., kitinase, kitosan, pepaya

ABSTRACT

The use of chitosan as a coating agent of harvested fruits is an alternative method in controlling anthracnose disease (*Colletotrichum* sp.). This study aimed to obtain an optimal enzymatic chitosan (EC) that hydrolyzed using chitinase from *Burkholderia cepacia* isolate E76. The optimal incubation condition to produce EC was 2 h with the yield of 3.52 ± 0.38 g. The degree of deacetylation (DD) chitosan and EC was 66.91% and 80.91%, respectively. Based on *in vitro* assays, EC 2% was the most effective in inhibiting the growth of *Colletotrichum* sp. (94.22%) than chitosan, while the highest inhibition for chitosan 3% was 55.26%. Moreover, the EC 2% showed the highest inhibition of spore germination (74.12%). The *in vivo* assay revealed that EC 2% showed the highest inhibition on the fungal growth (88.88%), compared to the other concentrations. On the other hand, the EC 2% and 3% gave similar results on inhibition of *Colletotrichum* sp. of chili (55.55%).

Key words: chilli, chitinase, chitosan, *Colletotrichum* sp., papaya

*Alamat penulis korespondensi: Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia. Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor 16111
Tel:0251 8337975, Faks:0251 8338820, Surel: yshid@yahoo.co.uk.

PENDAHULUAN

Pengembangan teknologi pengendalian penyakit antraknosa *Colletotrichum* sp. harus mempertimbangkan keamanan pangan dan mempertahankan kualitas buah agar dapat meningkatkan daya saing di pasar global. Penggunaan kitosan sebagai pelapis produk hasil panen tanaman hortikultura seperti buah-buahan untuk mengendalikan penyakit sudah dilakukan seperti pada pepaya (Gonzalez-Aguilar *et al.* 2009), jeruk (Rappussi *et al.* 2009), mentimun (Ben-Shalom *et al.* 2003) dan tomat (El-Mohamedy *et al.* 2013)

Kitosan (poliβ 1,4-D glukosamina) merupakan suatu amina polisakarida hasil proses distilasi kitin. Senyawa ini merupakan biopolimer alam yang bersifat polikationik dan banyak direkomendasikan dalam industri ramah lingkungan karena memiliki sifat biokompatibel, biodegradasi, nontoksik (Aranaz *et al.* 2009), dan biofungisida (El Ghaouth *et al.* 1992).

Efektivitas anticendawan kitosan dipengaruhi oleh jenis cendawan, konsentrasi, pH, pelarut, dan bobot molekul kitosan. Penelitian lanjut untuk aplikasinya diperlukan. Bakteri *Burkholderia cepacia* E76 dipilih sebagai penghasil kitinase karena bakteri endofit ini bersifat antagonis terhadap cendawan patogen, seperti *Rhizoctonia solani* (Wartono *et al.* 2012), *Ganoderma* sp. dan *Pyricularia oryzae* (Suryadi *et al.* 2014). Kitinase yang dihasilkan *B. cepacia* E76 berpeluang digunakan untuk memecah molekul kitosan dengan memotong ikatan glikosidik pada residu N-asetil glukosamina. Hilangnya residu N-asetil glukosamina pada kitosan dapat meningkatkan derajat distilasi kitosan yang menentukan kemampuannya sebagai antibakteri dan anticendawan (Zhong *et al.* 2009).

Penelitian ini bertujuan menggunakan kitinase asal *B. cepacia* isolat E76 pada hidrolisis kitosan untuk memproduksi kitosan enzimatik (KE), serta memperoleh konsentrasi kitosan yang efektif sebagai anticendawan untuk mengendalikan penyakit antraknosa.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan Kitinase dari *B. cepacia* E76 dan Derajat Distilasi

Isolat bakteri kitinolitik *B. cepacia* E76 diperoleh dari kultur koleksi Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik *Culture Collection*. Sebanyak 1 mL inokulum *B. cepacia* E76 berumur 48 jam diremajakan dalam 100 mL medium *luria broth* (LB) dan diinkubasikan selama 18 jam. Untuk memproduksi enzim, sebanyak 1 mL biakan bakteri diperbanyak dalam 200 mL medium kitin cair (Suryadi *et al.* 2014), diinkubasikan dalam alat pengocok dengan kecepatan 75 rpm pada suhu ruang selama 48 jam. Suspensi sel bakteri disentrifugasi pada kecepatan 8400 ×g selama 15 menit. Enzim diekstraksi dari supernatan menggunakan metode presipitasi amonium sulfat 70%. Campuran enzim disentrifugasi (Hitachi Himac CR 21F) dengan kecepatan 8400 ×g selama 20 menit, pelet yang diperoleh dilarutkan dalam 50 mL PBS pH 6.8.

Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan bovin serum albumin sebagai standar (Bradford 1976). Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit dengan mengukur produksi N-Asetil Glukosamina (GlcNAc) yang ditentukan pada absorbansi 420 nm menggunakan spektrofotometer (Hitachi U2800, Japan). Satu unit enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan 1 mol GlnNAc per menit.

Sebanyak 6 g serbuk kitosan (Sigma Aldrich; BM 600 kDa) dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 1% dan dikocok menggunakan pengaduk magnetik (Fisher Sci, USA) selama 24 jam untuk menghasilkan larutan kitosan 6%. Larutan ditambahi NaOH 2N 1:1 (v/v) dan hasil hidrolisis dipresipitasi dengan sentrifugasi (Hitachi Himac CR 21F, Japan) pada kecepatan 8400 ×g selama 20 menit.

Penyiapan kitosan enzimatik (KE) dibuat dari larutan kitosan 6% yang dihidrolisis menggunakan filtrat kitinase yang berasal dari *B. cepacia* E76. Perbandingan volume yang digunakan antara enzim kitinase dan larutan kitosan 6% ialah 1:100 (v/v). Larutan ini diinkubasi pada suhu 37 °C dengan variasi

waktu 1, 2, 3, 4, dan 5 jam. Proses hidrolisis, presipitasi, dan sentrifugasi sama dengan penyiapan kitosan. Pelet kitosan dan KE hasil sentrifugasi dibilas beberapa kali dengan akuades hingga pH netral, lalu disimpan dalam kulkas untuk uji lanjut (Kumar *et al.* 2007).

Derajat distilasi (DD) diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan larutan GlcNAc dalam 0.01 N asam asetat sebagai standar (Yuan *et al.* 2011). Nilai absorbannya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U2800, Japan) pada panjang gelombang 202 nm. Nilai DD (%) dihitung berdasarkan persamaan sebagai berikut:

$$DD = 100\% - \frac{\text{konsentrasi GlcNAc terbaca}}{\text{konsentrasi kitosan yang digunakan}}$$

Uji *Colletotrichum sp.* secara *in Vitro* pada Medium Agar-agar Mengandung Kitosan

Jaringan buah pepaya (ukuran $\pm 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) dari bagian tepi buah bergejala antraknosa/sehat, ditumbuhkan pada medium agar-agar dekstrosa kentang (ADK) (Difco, USA) dengan penambahan streptomisin sulfat 0.2%. Cendawan yang memiliki ciri-ciri *Colletotrichum sp.* sesuai dengan panduan Barnett dan Hunter (1998) dimurnikan menggunakan metode spora tunggal.

Uji *in vitro* dilakukan dengan metode difusi agar-agar (Salinas *et al.* 2007). Sebanyak 30 μL masing-masing konsentrasi kitosan dan KE (1, 2, 3, 4, dan 5%) dicampurkan ke dalam 15 mL ADK cair pada cawan Petri (diameter 9 mm). Kontrol disiapkan tanpa menggunakan kitosan. Potongan kecil ($\pm 0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$) biakan *Colletotrichum sp.* diletakkan di tengah medium ADK dan kitosan dalam cawan Petri, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 4–7 hari dengan kondisi gelap-terang (interval 12 jam). Percobaan ini diulang sebanyak 3 kali.

Diameter koloni *Colletotrichum sp.* diukur hingga perlakuan kontrol tumbuh memenuhi medium agar-agar. Tingkat hambat relatif pertumbuhan cendawan (THRc) dihitung menggunakan rumus:

$$\text{THRc} = \frac{A-B}{A} \times 100\%, \text{ dengan}$$

A, diameter koloni kontrol; B, diameter koloni perlakuan.

Pengaruh KE terhadap Daya Kecambah Konidium *Colletotrichum sp.*

Biakan suspensi konidia *Colletotrichum sp.* berumur 5 hari disuspensikan dengan air steril disaring dengan kasa bersih, selanjutnya suspensi konidium diteteskan pada gelas kaca untuk dihitung konidiumnya. Kerapatan konidium diatur menjadi 10^5 konidium mL^{-1} . Sebanyak 5 mL suspensi konidium dicampur dengan kitosan dalam berbagai konsentrasi (1, 2, 3, 4 dan 5%). Masing-masing campuran suspensi konidium dan konsentrasi kitosan diletakkan pada gelas kaca datar sebanyak satu tetes dan dituangkan 10 μL medium ADK cair. Gelas kaca diinkubasikan selama 24 jam dan konidium yang berkecambah dihitung menggunakan mikroskop. Percobaan ini diulang dua kali. Persentase perkecambahan (PP) konidium dihitung dengan rumus:

$$\text{PP} (\%) = \frac{\sum \text{konidium berkecambah}}{\sum \text{konidium yang diamati}} \times 100$$

Pengaruh KE terhadap *Colletotrichum sp.* pada Uji *in Vivo*

Buah pepaya var. California dan cabai var. Hot Chili yang seragam (secara morfologi, tingkat kematangan, serta sehat secara visual) dicuci bersih. Selanjutnya sebanyak 1 mL suspensi konidium *Colletotrichum sp.* (10^5 konidium mL^{-1}) diinokulasikan dengan cara menyuntikan inokulum secara merata pada seluruh permukaan buah menggunakan suntikan steril. Buah dikeringanginkan selama 20 menit, kemudian direndam dalam larutan kitosan pada konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5%, lalu dikeringanginkan kembali selama 20 menit. Buah selanjutnya disimpan dalam wadah yang ditutup untuk menjaga kelembapannya.

Pertumbuhan *Colletotrichum sp.* diamati berdasarkan pada skor tingkat keparahan penyakit. Skor keparahan ditetapkan dalam 5 skala yang dimodifikasi dari prosedur James (1971), yaitu buah sehat: 0; 1–20%: 1; 21–40%: 2; 41–60%: 3; 61–80%: 4 dan; 81–100%: 5. Nilai keparahan penyakit antraknosa (*Colletotrichum sp.*) dihitung dengan rumus:

$$\text{KP} = \frac{\sum_{i=1}^k (n_i \times v_i)}{Z \times N} \times 100, \text{ dengan}$$

KP, keparahan penyakit (tingkat kerusakan buah); k, banyaknya kategori skoring keparahan penyakit; n_p , jumlah buah dalam setiap kategori; v_p , nilai skala keparahan penyakit; Z, nilai skala dari keparahan penyakit tertinggi; N, jumlah buah contoh yang diamati.

Tingkat hambat relatif (THR) dihitung dengan rumus:

$$\text{THR} = \frac{\text{KPk} - \text{KPP}}{\text{KPk}} \times 100, \text{ dengan}$$

KPk, keparahan penyakit pada kontrol; KPP, keparahan penyakit pada perlakuan.

Penelitian *in vivo* disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 4 kali ulangan. Data dianalisis menggunakan program Sirichai v 6.0 dan uji beda rata-rata dinyatakan pada taraf α 5%.

HASIL

Kitinase *B. cepacia* E76

Kitinase yang dihasilkan oleh bakteri *B. cepacia* E76 memiliki aktivitas enzim sebesar 39.661 U, kadar protein sebesar 218.213 ppm, dan aktivitas spesifik enzim sebesar 0.18 U mg^{-1} . Kitosan yang dihasilkan berbentuk koloid pasta berwarna putih kekuningan, dengan total bobot massa sebesar 9.455 g. Total bobot KE hasil hidrolisis dalam larutan asam asetat 1% dan kitinase dihasilkan sebanyak 28.25 g. Waktu inkubasi efektif untuk menghasilkan kitosan enzimatis (KE) terbanyak adalah selama 2 jam inkubasi dengan rata-rata bobot massa yang dihasilkan sebesar $3.52 \pm 0.38 \text{ g}$ (Gambar 1). Nilai DD KE diperoleh sebesar 80.91%, yaitu lebih tinggi 14% dibandingkan dengan nilai DD kitosan sebesar 66.91%. Hal

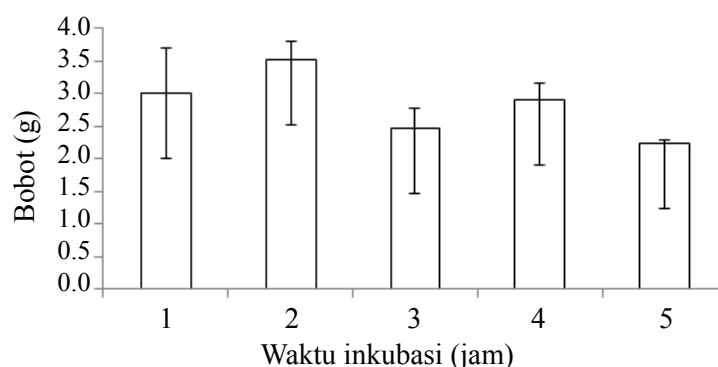
ini mengindikasikan bahwa terdapat pengaruh yang jelas pada penambahan enzim terhadap besarnya peningkatan nilai DD kitosan (Gambar 2).

Tingkat Hambat Relatif *Colletotrichum* sp. pada Uji *in Vitro*

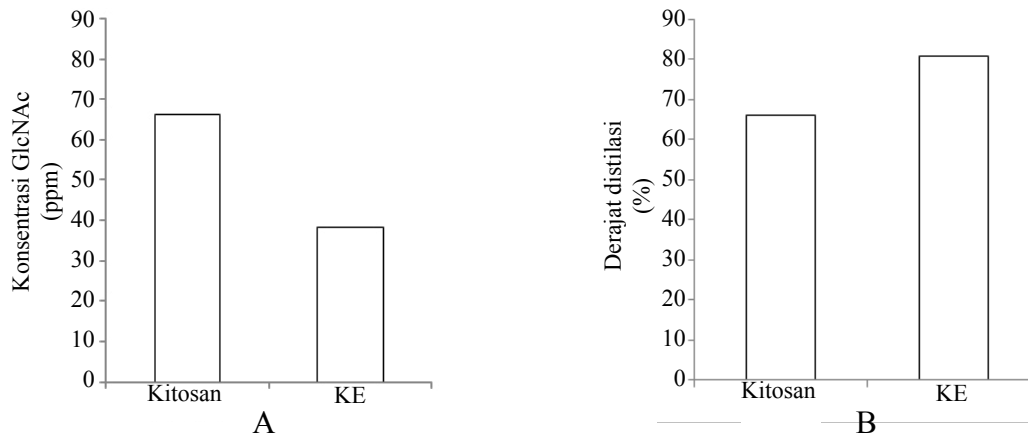
Uji *in vitro* kitosan menunjukkan penghambatan *Colletotrichum* sp. tertinggi pada konsentrasi 3%, sedangkan KE pada konsentrasi 2% (Gambar 3). Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa kitosan konsentrasi 3% paling optimal dalam menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. secara *in vitro* dengan penghambatan sebesar 55.26%, sedangkan daya hambat terbesar KE terhadap patogen pada konsentrasi 2% sebesar 94.22%. Konsentrasi kitosan 3% terbukti efektif dapat menghambat pertumbuhan patogen, tetapi selanjutnya menurun pada konsentrasi lebih besar dari 3%. Demikian pula dengan konsentrasi optimum KE yang efektif dalam menghambat patogen ialah 2%, dan terlihat menurun pada konsentrasi lebih besar dari 2%.

Daya Kecambah Konidium *Colletotrichum* sp.

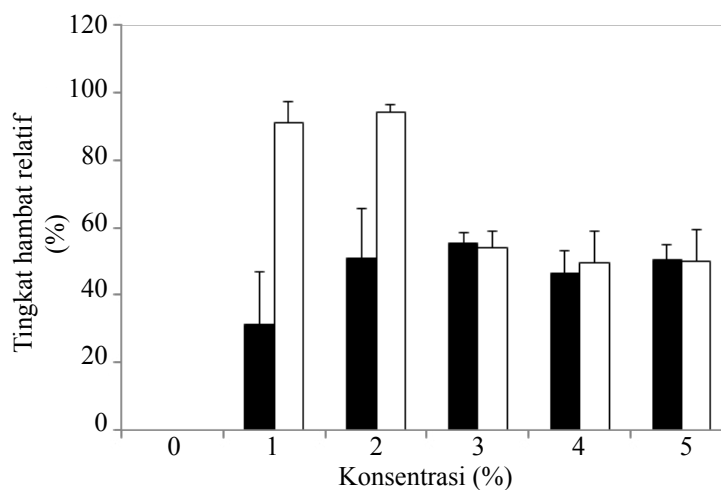
Ada variasi penghambatan perkecambahan konidium oleh konsentrasi kitosan. Hal ini dibuktikan pada masing-masing perlakuan KE menunjukkan tingkat hambat relatif yang berbeda-beda. Daya kecambah konidium pada kontrol (tanpa kitosan) sebesar 82.27% (Tabel 1). Konidium dengan perlakuan KE 1% menghambat perkecambahan konidium 46.24%, dan pada konsentrasi 2% dapat menekan perkecambahan konidium paling tinggi (74.12%). Selanjutnya daya hambat



Gambar 1 Pengaruh lama waktu inkubasi kitinase terhadap produksi kitosan enzimatis.



Gambar 2 Konsentrasi GlcNAc (A) dan Derajat distilasi kitosan dan kitosan-enzimatik (KE) (B) pada waktu inkubasi 2 jam.



Gambar 3 Pengaruh kitosan (■) dan kitosan-enzimatik (□) terhadap tingkat hambat relatif *Colletotrichum sp.* pada uji *in vitro*.

perkecambah konidium tersebut menurun pada konsentrasi KE yang lebih tinggi (3, 4, dan 5%), yaitu masing-masing sebesar 24.99, 24.05, dan 17.98%.

Pengaruh KE terhadap *Colletotrichum sp.* pada Uji *in Vivo*

Konsentrasi KE yang paling baik untuk menghambat pertumbuhan patogen *Colletotrichum sp.* pada pepaya ialah 2%, sedangkan pada cabai pada perlakuan konsentrasi 2 dan 3% (Tabel 2).

PEMBAHASAN

Proses distilasi kitosan secara enzimatik dapat menghasilkan kitosan dengan bobot

molekul yang relatif lebih rendah, dibuktikan dari peningkatan nilai DD. Nilai DD ialah ukuran besarnya penghilangan gugus asetil (dinyatakan dalam %) pada gugus asetamida pada kitin menjadi gugus amina. Nilai DD kitin ialah <50%, sedangkan pada kitosan ialah >50%. Aktivitas kitosan sangat dipengaruhi oleh nilai DDnya. Semakin tinggi DD kitosan, maka semakin tinggi aktivitas antibakteri dan anticendawannya (El-Mohamedy *et al.* 2013). Kitosan dengan DD yang tinggi lebih efektif sebagai antimikrob daripada kitosan yang lebih banyak mengandung gugus amino yang terasetilasi karena peningkatan kelarutan yang tinggi (Khan *et al.* 2002). Hasil penelitian Tikhonov *et al.* (2006) menyatakan bahwa perbedaan aktivitas antimikrob kitosan yang

Tabel 1 Pengaruh konsentrasi kitosan enzimatis (KE) terhadap perkecambahan konidium *Colletotrichum* sp. pada uji *in vitro*

Konsentrasi KE	Perkecambahan konidium rerata \pm SD (%)	Penghambatan konidium (%)
Kontrol (tanpa KE)	82.27 \pm 3.89	-
KE 1%	44.23 \pm 19.9	46.24
KE 2%	21.29 \pm 2.41	74.12
KE 3%	61.71 \pm 0.68	24.99
KE 4%	62.48 \pm 17.41	24.05
KE 5%	67.47 \pm 16.57	17.98

Tabel 2 Pengaruh konsentrasi kitosan enzimatis (KE) terhadap keparahan penyakit antraknosa (*Colletotrichum* sp.) pada pepaya dan cabai secara *in vivo*

Konsentrasi KE	Pepaya		Cabai	
	Keparahan penyakit (%)	THR (%)	Keparahan penyakit (%)	THR (%)
Kontrol (tanpa KE)	90 a	0.00	90 a	0.00
KE 1%	80 ab	11.11	70 ab	22.22
KE 2%	10 d	88.88	40 c	55.55
KE 3%	40 c	55.55	40 c	55.55
KE 4%	60 bc	33.33	60 b	33.33
KE 5%	70 ab	22.22	60 b	33.33
CV % (KK)	17.81	-	14.63	-

KE, kitosan enzimatis; THR, tingkat hambat relatif;

Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut DMRT pada α 5%.

disiapkan secara enzimatis disebabkan adanya perbedaan distribusi grup N-asetil pada ikatan polimer kitosan.

Grafik perbandingan pertumbuhan patogen pada uji *in vitro* menunjukkan bahwa KE mampu menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. lebih efektif dibandingkan dengan kitosan. Hal ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan efek penghambatan yang sama, maka KE memerlukan konsentrasi lebih rendah (1%) dibandingkan dengan kitosan. Park *et al.* (2011) dalam penelitiannya mengatakan bahwa kitosan tidak dapat terlarut sempurna dalam air, sedangkan KE diduga memiliki bobot molekul yang lebih rendah sehingga dapat lebih mudah larut dalam air dan memiliki perbedaan nyata dibandingkan dengan kitosan dalam hal aktivitasnya sebagai antimikrob.

Semakin tinggi konsentrasi kitosan yang digunakan, daya hambatnya terhadap

pertumbuhan patogen menurun. Hal ini diduga karena terlalu banyak molekul kitosan, maka gugus amino reaktif juga akan semakin banyak sehingga kemampuan kitosan untuk menempel pada permukaan patogen semakin menurun.

Perlakuan KE 2% menunjukkan daya hambat kecambah konidium *Colletotrichum* sp. paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi lainnya, yang berarti bahwa KE konsentrasi 2% lebih efektif dalam menghambat perkecambahan konidium patogen. Hasil uji perkecambahan konidium menguatkan hasil uji *in vivo*, yaitu KE 2% adalah konsentrasi paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. Hasil penelitian sejalan dengan Hernandez-Lauzardo *et al.* (2010), konsentrasi kitosan 2% menghambat perkecambahan spora *Rhizopus stolonifer*. Hasil penelitian Meng *et al.* (2010) juga menyatakan bahwa aplikasi oligokitosan

sangat menghambat perkecambahan spora dan pertumbuhan miselium *Alternaria kikuchiana* dan *Phylospora puricola* pada buah pir.

Hasil uji *in vivo* sejalan dengan uji *in vitro* bahwa konsentrasi KE 2% paling baik menghambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp. Berbeda dengan hasil penelitian Sitorus *et al.* (2014) yang melaporkan bahwa pelapisan buah jambu biji dengan kitosan pada konsentrasi 3% terlihat paling efektif dalam menghambat pertumbuhan patogen. Pelapisan pepaya dengan kitosan konsentrasi lebih tinggi (>3%) pada penelitian ini yang kurang efektif. Hal ini diduga karena pori pada permukaan buah tertutup rapat oleh kitosan yang terlalu tebal sehingga buah berfermentasi dan menjadi busuk. El Ghaouth *et al.* (1992) menyatakan pertumbuhan miselia *R. stolonifer* dihambat oleh perlakuan kitosan 3 mg mL⁻¹. Demikian pula Xu *et al.* (2007) menyatakan bahwa oligokitosan lebih efektif dibandingkan dengan kitosan dalam menghambat pertumbuhan *Phytophthora capsici* karena adanya perbedaan bobot molekul yang memengaruhi aktivitas anticendawannya. Pada bakteri, aktivitas kitosan bergantung pada grup amino yang reaktif, namun jika grup amino terlalu banyak maka kemampuan untuk menempel pada permukaan bakteri semakin menurun (Liu *et al.* 2001). Kitosan dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas kitinase dan β 1-3 glukukanase pada tanaman tomat terinfeksi *Ralstonia solanacearum* (Algam *et al.* 2010). Selain itu kitosan dapat mengimbas akumulasi fitoaleksin yang menghasilkan respons anticendawan dan meningkatkan perlindungan terhadap infeksi patogen lebih lanjut (Uthairatanakij *et al.* 2007; Sanchez-Dominguez *et al.* 2011).

Berdasarkan hasil penelitian ini produksi KE yang dihasilkan secara enzimatis menggunakan kitinase asal *B. cepacia* E76 ialah sebanyak 3.52 ± 0.38 g dengan waktu inkubasi 2 jam. Derajat distilasi (DD) KE lebih tinggi (80.91%) dibandingkan dengan DD kitosan (66.91%). KE 2% lebih baik dalam menghambat pertumbuhan patogen *Colletotrichum* sp. (penghambatan 94.22%), sedangkan kitosan 3% menunjukkan peng-

hambatan sebesar 55.26% pada uji *in vitro*. Perlakuan KE 2% menekan perkecambahan konidium sebesar 74.2%. Pada uji *in vivo* KE 2% menunjukkan penghambatan terbaik terhadap *Colletotrichum* sp. pada pepaya (88.88%), sedangkan penghambatan terbaik (55.55%) pada cabai ditunjukkan pada perlakuan KE konsentrasi 2% dan 3%.

DAFTAR PUSTAKA

- Algam SAE, Xie G, Li B, Yu S, Su T, Larsen J. 2010. Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia solanacearum* wilt in tomato. *J Plant Pathol.* 92(3):593–600.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed H, Heras A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr Chem Biol.* 3:203–230. DOI: <https://doi.org/10.2174/187231309788166415>.
- Barnett H L, Hunter BB. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, Fourth Edition. St. Paul (US): APS.
- Ben-Shalom N, Ardi R, Pinto R, Aki C, Fallik E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Prot.* 22(2):285–290. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00149-7).
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms quantities of protein in utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- El Ghaouth A, Arul J, Grenier J, Aselin A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.* 82:398–402. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-398>.
- El-Mohamedy Riad SR, Abdel-Kader MM, Abd-El-Kareem F, El-Mougy NS. 2013. Inhibitory effect of antagonistic bio-agents and chitosan on the growth of tomato root rot pathogens *in vitro*. *J Agric Technol.* 9(6):1521–1533.

- Gonzalez-Aguilar G, Valenzuela-Soto E, Lizardi-Mendoza J, Goycoolea F, Martinez-Tellez MA, Villegas-Ochoa MA, Monroy-Garcia IN, Ayala-Zavala JF. 2009. Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya Maradol. *J Sci Food Agric*. 89(1):15–23. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3405>.
- Hernandez-Lauzardo AN, Velazquez-del Valle MG, Guerra-Sanchez MG. 2011. Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *Afr J Microbiol Res*. 5(25):4243–4247. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR>.
- James WC. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Can Plant Dis Surv*. 51(2):39–65.
- Khan TA, Peh KK, Ching HS. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 5(3):205–212.
- Kumar ABV, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. 2007. Low molecular weight chitosan-preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1770(4):495–505. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.12.003>.
- Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao KD. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci*. 79(7):1324–1335. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L).
- Meng X, Yang L, Kennedy JF, Tian S. 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydr Polym*. 81(1):70–75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.057>.
- Park JK, Chung MJ, Choi HN, Park YI. 2011. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity. *Int J Mol Sci*. 201112(1):266–277. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms12010266>.
- Rappussi MCC, Pascholati SF, Benato EA, Cia P. 2009. Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest Valencia oranges. *Braz Arch Biol Technol*. 52(3):513–521. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000300001>.
- Salinas J, Palma-Guerrero J, Jansson HB, Lopez-Llorca LV. 2007. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J Appl Microbiol*. 104(2):541–553. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x>.
- Sanchez-Dominguez D, Rios MY, Castillo-Ocampo P, Zavala-Padilla G, Ramos-Garcia M, Bautista-Banos S. 2011. Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*-tomato. *Pestic Biochem Physiol*. 99(3):250–255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.01.003>.
- Sitorus RF, Karo T, Lubis Z. 2014. Pengaruh konsentrasi kitosan sebagai edible coating dan lama penyimpanan terhadap mutu buah jambu biji merah. *J Rekayasa Pangan Pertanian*. 2:37–46.
- Suryadi Y, Susilowati DN, Lestari P, Priyatno TP, Samudra IM, Hikmawati N, Mubarik NR. 2014. Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. *J Agric Technol*. 10(4):983–999.
- Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Janson HB, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV, Avdienko ID, Verlamov VP. 2006. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/derivatives. *Carbohydr Polym*. 64(1):66–72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.021>.
- Uthairatanakij A, Texeira da Silva JA, Obsuwan K. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Sci Biotechnol*. 1:1–5.

- Wartono, Suryadi Y, Susilowati DN. 2012. Keefektifan formulasi bakteri *Burkholderia cepacia* isolat E76 terhadap *Rhizoctonia solani* Kuhn pada pertumbuhan tanaman padi di laboratorium. J Agrotropika. 17(2):39–42.
- Xu J, Zhao X, Han X, Du Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and pathogenic fungi in vitro. Pestic Biochem Phys. 87(3):220–228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.013>.
- Yuan Y, Chesnutt BM, Haggard WO, Burngardner JD. 2011. Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. Materials. 4:1399–1416. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma4081399>.
- Zhong Z, Li P, Xing R, Liu S. 2009. Antimicrobial activity of hydroxylbenzenesulfonilides derivatives of chitosan, chitosan sulfates and carboxymethyl chitosan. Int J Biol Macromolec. 45(2):163–168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.020>.