

Sintesis Komposit Kitosan berbasis Selongsong *Black Soldier Fly (BSF)* dengan Ekstrak Daun Kipahit dan Uji Penghambatannya terhadap *Xanthomonas oryzae*

Sri Wahyuni^{1*}, Ridha Fauziyah²⁾, Muhammad Abdul Aziz¹⁾, Deden Dewantara Eris¹⁾, Haryo Tejo Prakoso¹⁾, Priyono¹⁾, Siswanto¹⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, PT. Riset Perkebunan Nusantara
Jl. Taman Kencana No 01, Bogor 16128, Indonesia

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

^{*} Penulis korespondensi: sri09wahyuni@gmail.com

Abstract

Synthesis of Chitosan Composite based on Black Soldier Fly (BSF) Exuviae with Kipahit Leaf Extract and its Inhibition Test against Xanthomonas oryzae. HDB disease is caused by Xanthomonas oryzae pv.oryzae, an important disease in rice plants. Recently, many organic compounds based antibacterial agents like chitosan are being developed. The potential raw materials for producing chitosan is Black Soldier Fly (BSF) exuviae. At the development, chitosan was formulated with other ingredients such as kipahit leaves (Tithonia diversifolia) extract. This study aimed to synthesize BSF-based chitosan, formulate BSF-based chitosan composites with kipahit leaf extract using 0.1% sodium tripolyphosphate and evaluate the antibacterial activity against Xanthomonas oryzae. The optimization of kipahit leaves extraction was performed with a solvent varieties (2% acetic acid, 96% ethanol and 20% DMSO). The antibacterial activity assay was performed by the disc diffusion method (0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1% (w/v)). The results showed that the optimum kipahit leaf extract was obtained using 96% ethanol. The kipahit leaf extract was successfully formulated with BSF-based chitosan to form a BSF-kipahit leaf chitosan composite. According to the anti-bacterial activity assay, the potential composite of kipahit leaf extract and BSF-based chitosan was obtained at a concentration of 1%. However, the effectiveness of its inhibition against the growth of Xanthomonas oryzae is less than the individual BSF-based chitosan.

Keywords: antibacterial; chitosan-BSF; kipahit leaf; *Xoo*.

Abstrak

Penyakit HDB yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* (*Xoo*) sangat rentan terjadi pada tanaman padi. Antibakteri berbahan organik saat ini mulai banyak dikembangkan, salah satunya adalah kitosan. Salah satu bahan baku potensial untuk memproduksi kitosan adalah limbah selongsong *Black Soldier Fly (BSF)*. Dalam perkembangannya, kitosan banyak diformulasikan dengan bahan lain termasuk daun kipahit (*Tithonia diversifolia*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mensintesis kitosan-BSF, memformulasi komposit kitosan-BSF dengan ekstrak daun kipahit menggunakan Natrium Tripolifosfat 0,1% serta menguji aktivitas antibakteri komposit terhadap *Xanthomonas oryzae*. Optimasi proses ekstraksi daun kipahit dilakukan dengan variasi pelarut (asam asetat 2%, etanol 96% dan DMSO 20%). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram pada konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 % (b/v). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi daun kipahit terbaik didapatkan dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak daun kipahit tersebut berhasil diformulasikan dengan kitosan berbasis BSF membentuk komposit kitosan BSF-daun kipahit. Berdasarkan pengujian aktivitas antibakteri, komposit ekstrak daun kipahit dan kitosan berbasis BSF berpotensi sebagai antibakteri dengan persen penghambatan terbaik didapatkan pada konsentrasi 1%. Namun efektivitas penghambatannya terhadap pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* tergolong lemah dan lebih rendah dibandingkan kitosan-BSF secara tunggal.

Kata kunci: antibakteri; daun kipahit; kitosan BSF; *Xoo*.

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu subsektor pangan yang rentan terjadi gagal panen. Hal tersebut dapat diakibatkan oleh bencana alam, perlakuan pasca panen yang tidak optimal dan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT). Salah satu kegagalan panen yang disebabkan oleh OPT adalah penyakit Hawar Daun Bakteri (HDB). Penyakit HDB disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Wahyudi dkk. (2011) melaporkan bahwa serangan HDB pada musim hujan di Indonesia dapat mengurangi hasil panen sebesar 21-36%, sedangkan pada musim kemarau sebesar 18-28%. Upaya pengendalian HDB telah banyak dilakukan utamanya dengan penggunaan pestisida kimia bersifat bakterisida. Namun, residu yang dihasilkan berpotensi memberikan dampak buruk bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Sehingga, diperlukan solusi penanganan bakteri *Xoo* yang lebih ramah lingkungan, salah satunya dengan pestisida organik seperti pestisida nabati atau biopestisida. Pestisida nabati umumnya berbahan dasar tumbuhan yang mana memiliki kandungan bahan aktif tertentu yang dapat mengendalikan serangan hama. Selain ramah lingkungan dan residu pestisida organik mudah terdegradasi, penggunaan pestisida organik tidak menyebabkan resistensi pada hama (Wiratno dkk., 2011).

Kipahit (*Tithonia diversifolia*) merupakan tanaman berbunga yang dapat tumbuh secara liar dan mudah ditemukan. Pemanfaatan tanaman kipahit dalam dunia pertanian yaitu sebagai mulsa, bahan dasar pembuatan kompos dan pupuk hijau (Pramudika dkk., 2014). Hasil penelitian Sibagariang dkk. (2013) membuktikan ekstrak etanol daun kipahit memiliki berbagai aktivitas biologis salah satunya sebagai antibakteri. Namun, potensinya sebagai antibakteri masih tergolong lemah sehingga perlu diformulasikan dengan bahan aktif lain yang dapat menunjukkan sifat sinergis

Kitosan memiliki potensi sebagai antibakteri. Kitosan merupakan polisakarida yang banyak diekstrak dari cangkang udang atau rajungan. Banyak bahan baku lain yang memiliki kandungan kitin dan dapat diekstrak lebih lanjut menjadi kitosan, salah satunya adalah limbah selongsong pupa *Black Soldier Fly* (*BSF*) (Wahyuni dkk., 2020). Saat ini, selongsong *BSF* merupakan salah satu limbah terbanyak yang dihasilkan dari peternakan *BSF*. Wasko dkk. (2016) menyatakan bahwa pupa *BSF* yang sudah kosong (selongsong) dapat diproses menjadi kitosan melalui deasetilasi kitin selongsong *BSF*. Selain sebagai antibakteri, kitosan juga dapat meningkatkan efisiensi

fotosintesis, serapan hara, produksi tanaman dan mengurangi stress tanaman dan disinfeksi (Kaimudin dan Leounupun, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis kitosan-*BSF*, memformulasi komposit kitosan-*BSF* dengan ekstrak daun kipahit menggunakan natrium tripolifosfat 0,1% serta menguji aktivitas antibakteri komposit terhadap *Xanthomonas oryzae*. Melalui formulasi ini diharapkan dapat diperoleh komposit yang memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dari bahan tunggalnya. Aktivitas antibakteri dapat diketahui melalui uji aktivitas antibakteri sampel terhadap isolat *Xoo* secara in vitro.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI). Kegiatan yang dilakukan mencakup isolasi bakteri *Xoo*, ekstraksi kitosan dari selongsong *BSF*, ekstraksi daun kipahit, formulasi komposit kitosan-*BSF* dengan ekstrak kipahit dan pengujian aktivitas antibakteri komposit terhadap *Xanthomonas oryzae*.

Isolasi Bakteri *Xoo*

Isolasi *Xoo* dilakukan pada daun yang memiliki gejala HDB, daun bergejala dicuci kemudian dipotong kecil dan direndam dengan etanol 70% selama 30 detik, kemudian dibilas dengan akuades steril selama 30 detik, ditiriskan di atas *tissue* steril dan ditanam di atas media NA yang diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Satu ose koloni dari cawan sub kultur digoreskan kembali dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Semua proses dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (IRRI, 2010). Identifikasi bakteri *Xoo* dilakukan melalui beberapa parameter diantaranya: pengujian koloni kuning dengan cara bakteri ditumbuhkan pada media YDCA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang (Schaad dkk., 2001), uji pewarnaan tunggal dengan menggunakan pewarna *methylene blue* (Tortora dkk., 2010), uji KOH 3% untuk mengetahui jenis Gram bakteri (Wanger dkk., 2017), uji hipersensitivitas dan uji patogenisitas (Wahyudi dkk., 2011).

Formulasi Komposit Kitosan-*BSF* dengan Ekstrak Daun Kipahit

a. Ekstraksi kitosan-*BSF*

Ekstraksi kitin dari selongsong pupa *BSF* dilakukan dengan perbandingan pelarut 1:20 (F:S) melalui proses demineralisasi, deproteinasi, depigmentasi dan deasetilasi. Proses demineralisasi dilakukan dengan menggunakan HCl 2 M selama 36 jam dan dicuci sampai netral. Proses deproteinasi dilakukan dengan menggunakan NaOH 3 M selama 36 jam dan dicuci sampai netral. Proses depigmentasi menggunakan KMnO_4 1% dan dilanjutkan asam

oksalat 1% dengan pengadukan masing-masing selama 2 jam dan dicuci sampai netral. Kitin yang diperoleh dilakukan deasetilasi dalam NaOH 50% dengan perbandingan 1:20 (F:S) selama 10 jam dengan suhu 80°C dan dicuci sampai netral untuk mendapatkan kitosan (Modifikasi Wahyuni dkk., 2020)

b. Ekstraksi daun kipahit

Daun dikeringkan anginkan selama 10 hari, kemudian dihancurkan dan disaring dengan saringan 40 mesh (Alfarabi dkk., 2010). Ekstraksi dilakukan dengan variasi pelarut etil asetat, etanol 96%, dan n-heksan. Sebanyak 7 g daun kipahit diekstrak dengan pelarut dengan ratio 1:10 selama 48 jam, kemudian disaring menggunakan *vacum filter* (Septiana dan Asnani, 2012).

c. Formulasi komposit kitosan-BSF dengan ekstrak kipahit

Sebanyak 0,4 g ekstrak kental daun kipahit dilarutkan dalam 50 ml etanol 96%. Larutan tersebut sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan ke dalam 50 mL larutan Na-TTP 0,1% pada pengadukan 1500 rpm selama 30 menit. Campuran tersebut ditambahkan ke dalam larutan kitosan-BSF 0,2% setetes demi setetes dalam pengadukan 1500 rpm selama 3 jam.

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Xanthomonas oryzae*.

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Xanthomonas oryzae* dilakukan pada konsentrasi larutan 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 % (b/v). Sebanyak 100 µL suspensi bakteri diteteskan ke dalam cawan petri steril. Sebanyak 20 mL media NA steril dituang ke dalam cawan yang berisi suspensi bakteri dan dihomogenkan. Sebanyak 2 mL masing-masing larutan uji dan larutan kontrol diteteskan pada kertas cakram kosong. Larutan streptomisin sulfat 0,2% digunakan sebagai kontrol positif dan asam asetat 2% sebagai kontrol negatif. Kertas cakram diletakkan diatas permukaan media yang sebelumnya telah dilakukan pembiakkan bakteri. Media yang telah diisi sediaan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak 5 ulangan. Pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk dilakukan menggunakan jangka sorong. Persentase efektivitas daya hambat sampel dihitung berdasarkan persamaan Arora dan Bhardwaj (1997) berikut:

$$\%E = \frac{D}{D_a} \times 100\%$$

Keterangan:

E = Efektivitas daya hambat (%)

D = diameter zona bening sampel (mm)

D_a = diameter zona bening antibiotik (kontrol positif) (mm)

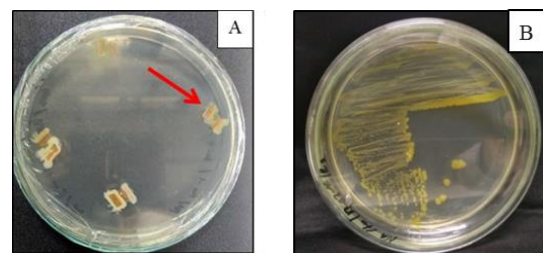
Data diameter zona bening yang diperoleh dari pengukuran cakram dianalisis ANOVA menggunakan aplikasi SPSS 25. Analisis uji lanjutan dilakukan

dengan analisis Uji Duncan untuk mengetahui pengaruh beda nyata variasi konsentrasi, jenis pelarut dan konsentrasi Na-TTP saat pembuatan kitosan *BSF*-ekstrak daun kipahit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

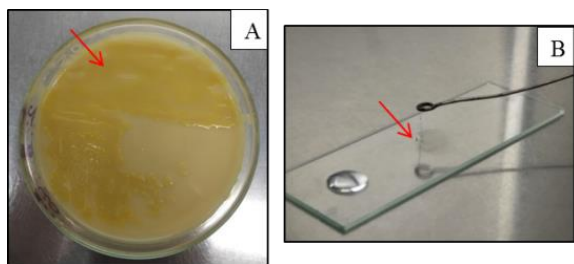
Isolasi Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Isolasi bakteri *Xoo* dilakukan pada daun padi dengan gejala penyakit HDB yang ditandai dengan daun berwarna kuning dari ujung daun dan menyebar ke area tepi daun. Hasil isolasi kemudian diamati dan dipilih bakteri yang memiliki morfologi dan warna *Xoo* (kuning) seperti pada Gambar 1.



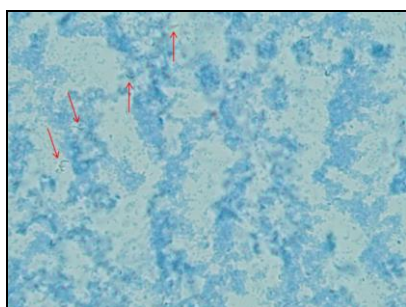
Gambar 1. Hasil isolasi bakteri *Xoo* dari daun padi terserang penyakit HDB (A) dan subkultur isolat *Xoo* pada media NA (B).

Bakteri *Xoo* memiliki morfologi berbentuk batang pendek dengan ukuran 0.45-0.75 × 0.65-2.1 µm dan memiliki satu flagella polar di salah satu ujungnya dan koloni bakteri berwarna kekuningan. Tingkat virulensi bakteri *Xoo* bergantung pada kondisi lingkungan sehingga perlu dilakukan isolasi bakteri dari daun padi yang terinfeksi (Degrassi dkk., 2010). Isolasi bakteri dilakukan dari daun yang memiliki gejala HDB yang ditandai warna kuning pucat pada tepi daun (Wahyudi, 2011). Hasil isolasi bakteri menunjukkan bahwa bakteri membentuk koloni bulat cembung yang berwarna kuning dengan permukaan yang mengkilap. Warna kuning pada koloni bakteri *Xoo* disebabkan karena mengandung Xanthomodin (Jonit dkk., 2016), hal ini sesuai dengan deskripsi *Xoo* yang dijelaskan oleh Shankara dkk. (2017). Hasil karakterisasi bakteri menunjukkan isolat bakteri yang diduga *Xoo* berwarna kuning pada media YDCA (Gambar 2A). Hasil pengujian Gram menghasilkan bakteri Gram negatif yang ditunjukkan dengan terbentuknya benang halus ketika jarum ose diangkat (Gambar 2B) sebagai respon penambahan KOH 3% pada koloni bakteri yang diujikan. Pada bakteri Gram negatif, penambahan KOH 3% menyebabkan terjadinya lisis pada dinding sel bakteri sehingga menyebabkan materi DNA pada bakteri keluar. Hal inilah yang mengakibatkan reaksi berlendir dan melekat (Herawati, 2016).



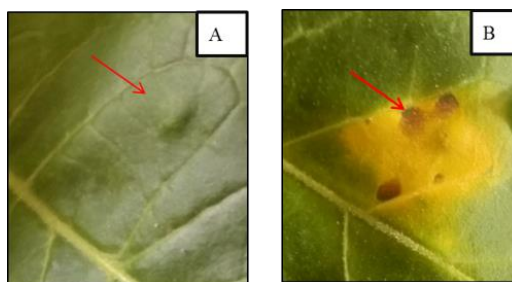
Gambar 2. Karakterisasi bakteri *Xoo*, Koloni yang diduga *Xoo* berwarna kuning pada media YDCA (A) dan pembentukan benang halus ketika jarum ose diangkat (B).

Hasil uji pewarnaan menunjukkan bakteri berbentuk basil terlihat dari warna biru pada permukaan bakteri yang membentuk basil (Gambar 3). Identifikasi bakteri yang diduga *Xoo* ini menggunakan pewarna *methylene blue* karena merupakan jenis pewarna basa yang bermuatan positif sehingga dapat berikatan dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif. Bakteri yang telah difiksasi dan diwarnai dengan *methylene blue* akan menjadi berwarna biru pada permukaan selnya (Tortora dkk., 2010).



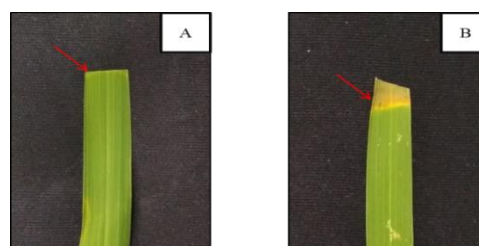
Gambar 3. Uji pewarnaan sederhana bakteri diduga *Xoo* dengan *methylen blue*

Uji hipersensitivitas bertujuan untuk mengetahui kemampuan patogen dalam menimbulkan penyakit. Hipersensitivitas merupakan pertahanan tercepat tanaman dalam menghadapi patogen dan disertai dengan kematian sel yang cepat dan terlokalisasi setelah diinjeksikan suspensi bakteri (Hardianto dkk., 2015). Uji hipersensitivitas bakteri *Xoo* hasil isolasi menunjukkan respon hipersensitif terhadap daun tembakau yang diinduksikan dengan suspensi bakteri *Xoo*, selain itu timbul nekrosis pada tempat induksi. Hasil uji terhadap kontrol negatif daun tembakau tidak menunjukkan gejala respon hipersensitif sehingga bakteri dikategorikan sebagai bakteri patogen tanaman seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4. Wahyudi dkk (2011) menyatakan bahwa induksi hipersensitivitas dan patogenitas dipengaruhi oleh gen *ghrp*. Gen tersebut umumnya ditemukan pada bakteri Gram negatif seperti *Xanthomonas* sp.



Gambar 4. Hasil uji hipersensitivitas terhadap daun tembakau kontrol (A) dan daun terinjeksi bakteri *Xoo* (B).

Hasil uji patogenitas (Gambar 5) menunjukkan adanya gejala yang mulai terlihat pada hari ketiga setelah dilakukan infeksi bakteri *Xoo*. Hal ini sejalan dengan Djatmoko dan Prakoso (2010) yang menyatakan bahwa masa inkubasi penyakit hawar daun bakteri adalah 3-5 hari. Menurut Sudir dkk. (2015) masa inkubasi tersebut bergantung pada varietas padi, patotipe *Xoo* dan kondisi lingkungan. Hasil uji patogenitas menunjukkan berubahnya warna daun yang diinfeksi *Xoo* menjadi warna kuning menyerupai gejala penyakit HDB pada bagian ujung daun, kemudian melebar ke bagian bawah daun. Sementara itu, pada kontrol negatif tidak terjadi perubahan pada ujung daun yang telah dilukai. Dengan demikian dapat diketahui bahwa perubahan warna daun tersebut disebabkan oleh infeksi bakteri *Xoo*. Bakteri *Xoo* dapat menginfeksi padi melalui luka kemudian bergerak dan bermultifikasi menuju pembuluh xilem (Wahyudi dkk., 2011). Salah satu penyebab suatu bakteri dapat menimbulkan penyakit adalah karena faktor virulensi (faktor patogenitas dan tingkat patogenitas) (Joko dkk., 2014).



Gambar 5. Hasil uji patogenitas terhadap daun padi, (A) Kontrol negatif dan (B) hasil infeksi bakteri *Xoo*

Formulasi Komposit Kitosan-BSF dengan Ekstrak Daun Kipahit

a. Ekstraksi daun kipahit

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi menghasilkan rendemen yang lebih kecil dibandingkan dengan metode ekstraksi lain, tetapi tidak membutuhkan pemanasan sehingga dapat

mencegah kerusakan senyawa yang kurang tahan terhadap panas (Ubulom dkk., 2011). Jenis pelarut dalam proses ekstraksi sangat mempengaruhi hasil ekstraksi (target senyawa aktif). Pelarut memiliki peran penting karena berkaitan dengan penarikan senyawa aktif sesuai dengan tingkat kepolarannya dalam pelarut atau sesuai dengan prinsip “*like dissolves like*”. Pelarut n-heksan memiliki kemampuan menarik senyawa-senyawa non-polar seperti lipid, steroid, minyak atsiri, dan etil memiliki kemampuan menarik senyawa-senyawa polar maupun nonpolar, sedangkan etanol 96% memiliki kemampuan menarik senyawa-senyawa semipolar secara spesifik (Fitriah dkk., 2017).

Hasil uji antibakteri dari berbagai senyawa yang diekstrak dengan berbagai pelarut (Tabel 1) menunjukkan bahwa hanya ekstrak etanol yang menghasilkan zona bening dengan nilai rata-rata 1,68 mm, namun daya hambat yang dihasilkan masih tergolong lemah. Ekstrak n-heksan tidak memiliki zona bening, hal ini diduga karena senyawa ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri bukan termasuk kelompok senyawa nonpolar, sehingga tidak larut dalam pelarut n-heksan yang bersifat nonpolar. Hasil uji antibakteri pelarut etil asetat tidak memberikan zona bening. Dalam ekstrak etil asetat daun kipahit, senyawa metabolit yang bersifat antibakteri tidak larut dalam etil asetat, sehingga tidak menghasilkan zona bening (Kumesan dkk., 2013). Oleh karena itu, pelarut etanol dipilih untuk ekstraksi kitosan *BSF*-ekstrak daun kipahit (Gambar 6A). Selain memiliki potensi sebagai antibakteri, etanol juga memiliki kelebihan tidak merusak komponen daun dengan tidak adanya perubahan warna ketika ekstraksi, titik didih rendah, tidak beracun dan tidak berbahaya sehingga dapat digunakan pada ekstraksi dari sampel makanan (Azis dkk., 2014).

Tabel 1. Hasil uji antibakteri dari ekstrak kipahit dalam berbagai pelarut

Ekstrak daun kipahit	Rata-rata (mm)	Efektivitas penghambatan (%)
n-heksan	0	0
Etil asetat	0	0
Etanol 96%	1.68	19.24
Kontrol –	0	0
Kontrol +	8.73	-

Keterangan:

K- : Akuades

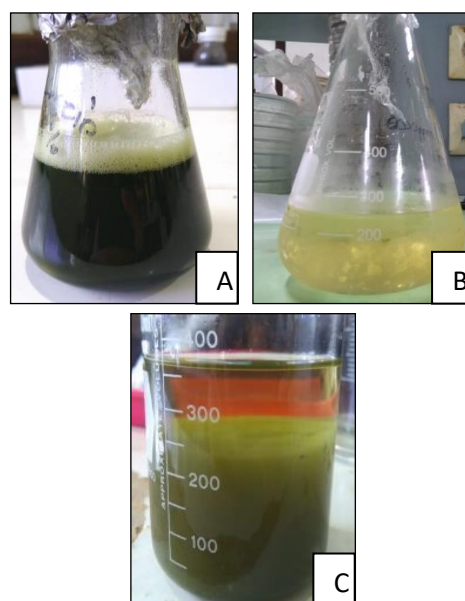
K+ : Streptomisin sulfat 0.2%

b. Sintesis kitosan berbasis *BSF*

Kitosan diekstrak dari limbah selongsong *BSF* sesuai dengan penelitian sebelumnya melalui tahapan demineralisasi, deproteinasi, depigmentasi dan deasetilasi (Wahyuni dkk., 2020). Hasil ekstraksi menghasilkan kitosan dengan kelarutan dan derajat deasetilasi masing-masing sebesar 87,95% dan 75,98%. Serbuk kitosan-*BSF* yang dihasilkan dilarutkan sebanyak 0,2 g dalam 100 ml asam asetat 2% (Gambar 6B).

c. Formulasi komposit kitosan berbasis *BSF* dengan ekstrak kipahit.

Pembuatan kitosan *BSF*-ekstrak daun kipahit dapat dilihat pada Gambar 6C. formulasi dilakukan dengan metode gelas ionik. metode ini dipilih karena proses yang sederhana dan mudah dikontrol dibandingkan dengan metode lain serta tidak menggunakan pelarut organik. Pada metode ini akan terjadi interaksi antara gugus amino bermuatan positif pada kitosan dengan polianion dan memicu terbentuknya struktur *network* inter dan intra dalam rantai polimer tiga dimensi.



Gambar 6. Ekstrak daun kipahit dalam pelarut etanol 96% (A), kitosan-*BSF* 0,2% (B) dan komposit kitosan-*BSF* dengan ekstrak kipahit dalam NaTPP 0,1% (C)

Polianion yang digunakan adalah NaTPP yang merupakan *crosslinker* non toksik yang memiliki banyak muatan negatif sehingga dapat berikatan lebih kuat dibandingkan polianion lain (Alauhdin dan Widiarti, 2014). Penggunaan *crosslinker* secara fisik melalui interaksi elektrostatis tidak hanya dapat menghindari penggunaan pelarut organik namun juga dapat menghindari kemungkinan toksisitas dari pereaksi. Oleh karena itu, penggunaan *crosslinker*

dinilai lebih bersifat *biocompatible* (Nur, 2011). Proses pembuatan larutan kitosan dengan menggunakan NaTPP sebagai *crosslinker* diawali dengan pelarutan kitosan (polikationik) ke dalam asam amin bebas sehingga terprotonasi dan menghasilkan -NH^+ . Ion hidroksil NaTPP ($\text{Na}_5\text{H}_3\text{O}_{10}$) bergabung dengan struktur kitosan. Reaksi sambung silang terjadi secara ionik dan deprotonasi. Reaksi secara deprotonasi terjadi antara ion -OH^- dari NaTPP dengan ion -NH_3^+ dari kitosan, sedangkan reaksi ionik terjadi antara ion $\text{-P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ dari NaTPP dengan ion -NH_3^+ dari kitosan. Semakin banyak ikatan silang, akan meningkatkan jumlah pori yang terbentuk, sehingga semakin banyak zat aktif yang akan terperap (Dewandari dkk., 2013). Secara kualitatif, partikel kitosan-ekstrak *BSF*-ekstrak daun kipahit dengan NaTPP 0.1% dapat terlihat dari terjadinya perubahan warna dan terbentuknya koloid. Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak daun kipahit (diduga flavonoid) mengandung gugus hidroksil yang diduga dapat membentuk *crosslink* dengan kitosan. Gugus amin pada kitosan dapat berinteraksi dengan gugus hidroksil pada flavonoid yang berprotonasi menjadi O, sehingga terbentuk ikatan kompleks antara kitosan dan ekstrak (Putri dkk., 2018). Ratio komposit kitosan *BSF*, ekstrak daun kipahit dan NaTPP yang digunakan

dalam penelitian ini yaitu 6:1:1. Konsentrasi kitosan harus lebih besar dari konsentrasi NaTPP yang digunakan, konsentrasi NaTPP yang lebih tinggi dari kitosan dapat menyebabkan terjadinya penggumpalan (aglomerasi) pada molekul-molekul kitosan (Ibrahim dkk., 2015).

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Xanthomonas oryzae*.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram dengan inkubasi selama 7 hari. Larutan uji diinjeksikan ke dalam cakram, sehingga cakram mengandung larutan uji dan akan berinteraksi dengan bakteri setelah sampel terdifusi (Alaga dkk., 2014). Aktivitas antibakteri sampel dilakukan pada 3 jenis larutan dalam 5 konsentrasi. Bakteri *Xoo* merupakan bakteri Gram negatif, streptomisin digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian karena dapat menghambat sintesis protein sel mikroba secara reversibel dengan cara berikatan dengan ribosom 30S dan menyebabkan kodon pada mRNA mengalami salah pembacaan oleh tRNA pada saat sintesis protein. Streptomisin memiliki peran sangat penting dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif (Raini, 2015).

Tabel 2. Pengaruh jenis larutan uji dan konsentrasi terhadap persen penghambatan terhadap bakteri *Xoo*

Larutan Uji	Persen penghambatan terhadap konsentrasi larutan uji (%)					
	0,1%	0,2%	0,4%	0,6%	0,8%	1%
Ekstrak daun kipahit	14,06% ^{abc}	13,40% ^{ab}	14,82% ^{abc}	12,81% ^a	14,54% ^{abc}	14,76% ^{abc}
Kitosan- <i>BSF</i>	25,11% ^{def}	29,83% ^{efg}	31,24% ^{fg}	35,93% ^g	30,37% ^{efg}	26,62% ^{defg}
Komposit kitosan <i>BSF</i> -ekstrak kipahit	17,99% ^{abcd}	21,57% ^{abcde}	22,43% ^{bcdef}	22,82% ^{bcdef}	23,33% ^{cdef}	23,56% ^{cdef}

* Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji Tukey pada $\alpha = 5\%$

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kipahit menghasilkan zona bening sebesar 3,32 mm dengan efektivitas penghambatan 14,82% (Tabel 2), sedangkan efektivitas penghambatan terbesar dihasilkan oleh kitosan-*BSF* yang dipalikasikan secara tunggal dengan zona bening sebesar 8,06 mm dengan efektivitas penghambatan 35,93%. Berdasarkan hasil tersebut maka ekstrak etanol daun kipahit memiliki daya hambat yang lemah karena diameter yang dihasilkan < 5 mm, sedangkan kitosan-*BSF* memiliki daya hambat menengah karena diameter ada pada rentang 5-10 mm (Alaga dkk., 2014). Berbeda dengan hasil penelitian Purwaningsih dan Apriandini (2020) bahwa ekstrak etanol daun kipahit memiliki daya hambat yang tergolong menengah (diameter zona bening 5-10 mm) terhadap bakteri *Propionibacterium*

acnes. Renhoar (2012) menyatakan bahwa pada umumnya bakteri Gram positif lebih peka terhadap senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba. Perbedaan sensitifitas bakteri Gram positif dan negatif dapat disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel pada masing-masing bakteri. Pada Tabel 2 ditunjukkan bahwa kitosan-*BSF* memiliki potensi antibakteri lebih besar dibandingkan kompositnya (kitosan-*BSF* dan ekstrak daun kipahit). Hal ini diduga karena proses *binding* antara kitosan *BSF* dengan ekstrak daun kipahit dalam pembentukan komposit kitosan-*BSF* dan ekstrak daun kipahit menghasilkan reaksi antagonis yang menyebabkan inaktivasi kitosan *BSF*.

Menurut Sarwono (2010) terdapat 3 mekanisme aktivitas antimikroba pada kitosan.

Pertama, aktivitas antimikroba terjadi karena adanya interaksi antara muatan positif pada molekul kitosan dengan muatan negatif pada membran sel mikroba. Interaksi tersebut yaitu gaya elektrostatik antara gugus NH_3^+ dengan Ca^{2+} yang terdapat pada permukaan membran sel. Adanya interaksi elektrostatik tersebut menyebabkan perubahan sifat permeabilitas membran yang memicu ketidak seimbangan tekanan osmotik internal sehingga pertumbuhan mikroba dapat terhambat. Mekanisme kedua melibatkan interaksi kitosan dengan senyawa yang terdapat pada permukaan sel bakteri, kemudian teradsorpsi dan membentuk lapisan pada permukaan sel yang memicu penghambat saluran transportasi sel. Hal ini dapat menyebabkan kekurangan substansi sel untuk berkembang biak sehingga menyebabkan kematian sel bakteri (Sarwono, 2010).

KESIMPULAN

Ekstraksi daun kipahit terbaik didapatkan dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak daun kipahit tersebut berhasil diformulasikan dengan kitosan berbasis *BSF* membentuk komposit kitosan *BSF*-daun kipahit. Komposit ekstrak daun kipahit dan kitosan berbasis *BSF* berpotensi sebagai antibakteri dengan persen penghambatan terbaik didapatkan pada konsentrasi 1%. Namun efektivitas penghambatannya terhadap pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* tergolong lemah dan tidak lebih baik dibandingkan kitosan-*BSF* secara tunggal. Komposit kitosan-*BSF* dan ekstrak daun kipahit diduga menghasilkan reaksi antagonis yang menyebabkan inaktivasi kitosan *BSF*.

DAFTAR PUSTAKA

[IRRI] International Rice Research Institute. (2010). *Rice Grassy Stunt*. Philippines (PHI): The International Rice Research Institute.

Alaga, T.O., Edema, M.O., Atayese, A.O., dan Bankole, M. O. (2014). Phytochemical and in vitro Antibacterial Properties of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle Juice). *Journal of Medicinal Plants Research* 8(7): 339–344.

Alauhdin, M., dan N Widiarti. (2014). Sintesis dan Modifikasi Lapis Tipis Kitosan-Tripolifosfat. *Jurnal MIPA*. 37(1): 46-52

Alfarabi, M., Bintang, M., Suryani dan Safithri, M. (2010). The comparative ability of antioxidant activity of *Piper crocatum* in inhibiting fatty acid oxidation and free radical scavenging. *Hayati Journal of Biosciences*. 17(4): 201-2014.

Arora, D.S. dan G.J. Kaur (2007). Antibacterial Activity of Some Indian Medicinal Plants. *Journal of Natural Medicines*. (61): 131-317

Azis, T. Febrizky, S. dan Mario, A.D. (2014). Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Persen Yield Alkaloid dari Daun Salam India (*Murraya koenigii*). *Teknik Kimia*. 2(20): 1-6.

Degrassi, G., Devescovi, G., Bigirimana, J., dan Venturi, V. (2010). *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* XKK.12 contains an AroQgamma Chorismate Mutase that is involved in Rive Virulence. *Journal Phytopathology*.100(3): 262-270.

Dewardari, T.K., Yuliani, S., dan Yasni, S. (2013). Ekstraksi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum*). *Jurnal Pascapanen*, 10(2): 58-65.

Djarmoko, H.A., dan Prakoso, B. (2010). Keragaman patotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pada tanaman padi di tiga ketinggian tempat berdasarkan pola RAPD. *Agrivita*. 32(2): 155-162.

Fitriah, Mappiratu dan Prismawiyanti (2017). Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun tanaman johar (*Cassia siamea* Lamk.) dari beberapa tingkat kepolaran pelarut. *Kovalen*. 3(3): 242-251.

Hardianto, W., Hakim, L., dan Bakhtiar (2015). Ketahanan beberapa genotipe padi terhadap penyakit hawar daun bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Jurnal HPT Tropika*. 15(2): 152-163.

Herawati, A. (2016). Isolasi dan karakterisasi penyebab penyakit hawar daun bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) pada tanaman padi di wilayah Sulawesi Utara. *Jurnal Pertanian Berkelanjutan*. 4(3): 1-10.

Ibrahim, H.M., El-Bisi, M.K., Taha, G.M., dan El-Alfy, E.A. (2015). Chitosan nanopartikel loaded antibiotics as drug delivery biomaterial. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(10): 85-90.

Joko, T., Subandi, A., Kusumandari, N., Wibowo, A., dan Priyatmojo, A. (2014). Activities of plant cell walldegrading enzymes by bacterial soft rot of orchid. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 47(10):1239-1250.

Jonit, N.Q., Low, Y.C., dan Tan, G.H. (2016). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biochemical test, rice (*Oryza sativa*), bacteria leaf blight (BLB) disease, sekinchan. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 4(3): 63-69.

Kaimudin, M., dan Leounupun, M.F. (2016). Karakterisasi kitosan dari limbah udang dengan proses *bleaching* dan deasetilasi yang berbeda. *Majalah BIAM*. 12(1): 1-7.

Kumesan, Y.A.N., Yamlean, P.V.Y., dan Supriati, H.S. (2013). Formulasi dan Uji Aktivitas Gel Antijerawat Ekstrak Umbi Bakung (*Crinum Asiaticum* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2(2): 18-27.

- Nur S I. (2011). Preparasi dan karakterisasi kitosan-tripolifosfat sebagai eksipien dalam sediaan farmasi. *Skripsi*, Depok (ID): Universitas Indonesia.
- Pramudika, G., Tyasmoro, S.Y., dan Suminarti, N.E. (2014). Kombinasi kompos kotoran sapi dan paitan (*Tithonia diversifolia* L.) pada pertumbuhan dan hasil tanaman terung (*Solanum melongena* L.). *Jurnal Produksi Tanaman*. 2(3): 253-359.
- Purwaningsih, N.S., dan Apriandini, W. (2020). Uji efektivitas antibakteri dari ekstrak daun kipahit (*Tithonia diversifolia* (Hems L) A. Gray). terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. *Edu Masda Journal*. 4(1): 76-89.
- Putri, A.I., Sundaryono, A., dan Candra, I.N. (2018). Karakterisasi nanopartikel kitosan ekstrak daun ubi jalar (*Ipomea batatas* L.) menggunakan metode gelaso opnik. *Alotrop Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 2(2): 203-207.
- Raini, M. (2015). Kajian pestisida berbahan aktif antibiotika. *Jurnal Media Litbangkes*. 25(1): 33-42.
- Renhoar, W. (2012). Aktivitas antioksidan dan mikrobiologi ekstrak sargassum polycystum. *Skripsi*. Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor.
- Sarwono, R. (2010). Pemanfaatan kitin/kitosan sebagai bahan anti mikroba. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*. 12(1): 32-38.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. dan Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota (US): APS Press.
- Septiana, A.T., dan Asnani, A. (2012). Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumpun Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) menggunakan berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Agrointek*, 6(1): 22-28.
- Shankara, K., Patil, M.B., Pramaesh, D., Sunkad, G., Yenjerappa, S.T., Ibrahim, M., Rajesh, N.L., dan Chikkannaswamy. (2017). Characterization of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolated from rice growing regions of Southern India. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*. 5(4): 452-461.
- Sibagariang, Hanna, dan Santi, P. (2013). Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dari beberapa ekstrak Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray). *Skripsi*, Universitas Sumatera Utara.
- Sudir, Yuliana, D., dan Wirajaswadi, L. (2015). Komposisi dan sebaran patotipe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyakit pada padi di Nusa Tenggara Barat. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 34(2):113-120.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., dan Case, C.L. (2010). *Microbiology: An Intorduction 10th ed*. San Fransisco (US): Pearson.
- Ubulom, P., Akpabio, E., Udobi, C.E., Mbon, R. (2011). Antifungal activity of aqueous and ethanolic extracts of *Picralima nitida* seeds on *Aspergillus flavor*, *Candida albicans* and *Microsporus canis*. *Research Pharmaceutical Biotechnology*. 3(5): 57-60.
- Wahyudi, A.T., Meliah, S., dan Nawangsih, A.A. (2011). *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada isolasi, karakterisasi dan telaah mutagenesis dengan trasnposon. *Makara Sains*. 15(1): 89-96.
- Wahyuni, S., Selvina R., Fauziyah R., Prakoso H.T., Priyono dan Siswanto (2020). Optimasi suhu dan waktu deasetilasi kitin berbasis selongsong maggot (*Hermetia Illucens*) menjadi kitosan. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25(3): 375-383.
- Wanger, I., Chavez, V., Huang, R.S.P., Wahed, A., Actor J.K., dan Dasgupta, A. (2017). *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*. Texas (US): Elsevier.
- Wasko, A., Bulak, P., dan Berecka, M.P. (2016). The first report of the physicochemical structure of kitin isolated from *Hermetia illucens*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 92(1): 316-316.
- Wiratno, Rizal, M., dan Laba, I.W. (2011). Potensi ekstrak tanaman obat dan aromatik sebagai pengendali keong mas. *Buletin Litro*. 22(1): 54-64.