

Uji Optimasi In Vitro Antibakteri Nanopartikel Kitosan Berbagai Konsentrasi Terhadap Pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Siswanti^{1)*}, Nanik Hidayati²⁾, Sri Sari Utami³⁾

^{1)*}Akademi Pertanian Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia, siswanti.ssi@gmail.com

²⁾ Akademi Pertanian Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia, nanikhid4@gmail.com

³⁾Akademi Pertanian Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia, sari.sariutami@gmail.com

Abstrak

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) merupakan bakteri patogen yang menyerang padi dan sulit dikendalikan. Pengendalian hayati kitosan telah banyak dikembangkan dan lebih efektif dalam nanopartikel. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan konsentrasi nanopartikel kitosan sebagai antibakteri terhadap *Xoo* bervariasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimal nanopartikel kitosan sebagai antibakteri terhadap *Xoo* secara in vitro. Penelitian dilakukan optimasi nanopartikel pertama konsentrasi 0,06%; 0,07%; 0,08%; 0,09%; 0,1%. Konsentrasi optimal dioptimasi kedua, kemudian konsentrasi paling optimal dioptimasi ketiga dengan kenaikan 0,005%. Satu mL suspensi *Xoo* dicampurkan merata dalam 100 mL medium PSA kemudian dituang dalam 5 petri. *Paper disc* steril diameter 7 mm ditetesi 0,1 mL akuades steril (kontrol 1), asam asetat 1% (kontrol 2), kitosan (CN) di optimasi pertama, dan nanopartikel kitosan (CNP) secara terpisah dan setelah kering diletakkan di medium PSA. Diameter zona hambat (pada jarak cm dari *paper disc*) diukur pada hari ke-2, 4, 6 setelah perlakuan. Optimasi dilakukan sebanyak 3x. Data dianalisis menggunakan variansi ANOVA aras 0,05. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi nanopartikel kitosan 0,06% dan 0,08% lebih optimal pada optimasi pertama. Optimasi kedua menunjukkan konsentrasi 0,06% lebih baik dibandingkan 0,08% meskipun tidak berbeda signifikan. Kenaikan konsentrasi 0,005 pada optimasi ketiga tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kemampuan antibakterinya.

Kata kunci: antibakteri, kitosan nanopartikel, optimasi, *Xoo*

Abstract

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) is a pathogenic bacterium that attacks rice crops and is difficult to control. Chitosan-based biological control has been widely developed and is more effective in the form of nanoparticles. Previous studies have shown that the concentration of chitosan nanoparticles as an antibacterial agent against *Xoo* varies. This study aimed to determine the optimal concentration of chitosan nanoparticles as an antibacterial against *Xoo* in vitro. Nanoparticle optimization was performed in three stages. The first optimization tested concentrations of 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, and 0.1%. The optimal concentration from this stage was evaluated in the second optimization, and the most optimal concentration was further tested in the third optimization with an increment of 0.005%. One milliliter of *Xoo* suspension was mixed uniformly into 100 mL of Potato Sucrose Agar (PSA) medium and poured into five Petri dishes. Sterile paper discs (7 mm in diameter) were treated with 0.1 mL of sterile distilled water (control 1), 1% acetic acid (control 2), chitosan (CN) from the first optimization, and chitosan nanoparticles (CNP) separately. Once dried, the discs were placed on the PSA medium. The diameter of the inhibition zone (measured in cm from the paper disc) was recorded on days 2, 4, and 6 post-treatment. The optimization process was repeated three times. Data were analyzed using the Analysis of Variance (ANOVA) at a significance level of 0.05. The results showed that chitosan

nanoparticle concentrations of 0.06% and 0.08% were more optimal in the first optimization. The second optimization revealed that the 0.06% concentration performed better than 0.08%, although the difference was not statistically significant. The 0.005 concentration increment in the third optimization showed no significant difference in its antibacterial capability.

Keywords: *antibacterial, chitosan nanoparticle, optimization, Xoo*

PENDAHULUAN

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) adalah bakteri patogen yang menyebabkan penyakit hawar daun bakteri (HDB) atau disebut juga *Bacterial Leaf Blight* (BLB). Penyakit HDB merupakan penyakit yang menyerang tanaman padi dan menjadi tantangan besar dalam program peningkatan produksi beras Nasional. Serangan penyakit HDB di Indonesia menunjukkan angka yang naik turun dari tahun 2016-2019, antara lain 62.100 ha, 42.622 ha, 46.140 ha, dan 39.494 ha. Serangan tertinggi penyakit HDB terjadi di Jawa Barat dan Jawa Tengah yang mencapai 7.000 ha pada tahun 2018-2020 (Suryaningsih et al., 2023). Pengendalian HDB yang telah dilakukan adalah dengan menggunakan varietas tahan, namun langkah ini masih terdapat kendala. Kendala yang muncul adalah patogen HDB cepat mengalami perubahan patotipe dan bersifat tular benih (*seedborne*) (Dewi et al., 2015). Cara lain mengendalikan HDB yaitu menggunakan bahan kimia, namun cara ini masih mempunyai kekurangan. Kekurangan tersebut antara lain membutuhkan biaya mahal, berbahaya, serta menimbulkan dampak buruk bagi kesehatan manusia dan lingkungan apabila digunakan dalam jangka panjang. Pengendalian penyakit tanaman hayati telah banyak dikembangkan, salah satunya adalah penggunaan kitosan (Praveen et al., 2022).

Kitosan merupakan polimer alami hasil deasetilasi kitin yang diekstrak dari cangkang udang dan Crustacea lain (Praveen et al., 2022). Kitosan telah menunjukkan spektrum aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri gram-positif dan gram-negatif. Kitosan adalah polimer polisakarida linier yang terdiri dari N-asetil-D-glukosamin yang dihubungkan dengan ikatan β -(1–4) (Alqahtani et al., 2020). Kitosan juga merupakan komponen dinding sel fungi, yeast, dan alga. Kitosan merupakan salah satu stimulator resistensi yang paling efektif sebagai biostimulan tanaman yang meningkatkan ketahanannya terhadap patogen. Kitosan mulai digunakan pada tahun 80-an dan telah banyak penelitian yang membahas penggunaannya baik dalam kimia, kedokteran, maupun agrobiologi. Sifat fisikokimia kitosan yang unik seperti biokompatibilitas, non-toksistas, dan biodegradasi menjadi alasan digunakannya kitosan dalam berbagai bidang ilmu. Kitosan dan turunannya dapat menghambat pertumbuhan berbagai bakteri. Konsentrasi minimum penghambatan oleh kitosan terhadap pertumbuhan bakteri bervariasi mulai dari 0,05 hingga 0,1%. Penghambatan tergantung pada jenis bakteri, berat molekul kitosan, dan pH larutan (Shcherban, 2023). Mekanisme kitosan dalam penghambatan bakteri yang paling mungkin adalah adanya interaksi antara muatan positif kitosan dengan muatan negatif pada permukaan sel bakteri dimana dapat merubah permukaan sel yang luas dan merubah permeabilitas permukaan sel (Li et al., 2013).

Kitosan merupakan salah satu polimer yang paling menjanjikan untuk pengiriman bahan kimia pertanian dan mikronutrien secara efisien jika dalam ukuran nanopartikel. Peningkatan efisiensi ini disebabkan oleh luas permukaan yang lebih tinggi, mampu menginduksi aktivitas sistemik karena ukuran partikelnya lebih kecil, dan mobilitas yang lebih tinggi. Nanopartikel kitosan telah diteliti sebagai pembawa untuk pengiriman bahan aktif dalam berbagai aplikasi karena biokompatibilitas, biodegradabilitas, permeabilitas tinggi,

efektivitas biaya, non-toksisitas, dan kemampuan pembentukan film yang sangat baik (Kashyap et al., 2015). Mekanisme antibakteri nanopartikel kitosan terutama terjadi karena interaksi elektrostatis antara gugus amino terprotonisasi ($-\text{NH}_3^+$) dan muatan negatif pada komponen membran luar bakteri. Interaksi ini dapat mengganggu integritas membran, meningkatkan permeabilitas, dan menginduksi kebocoran isi intraselular (Rahaeng & Orintara, 2026).

Penelitian oleh Modina et al. (2009) menunjukkan bahwa uji in vitro antibakteri kitosan konsentrasi 300 ppm (0,03%), 400 ppm (0,04%), dan 500 ppm (0,05%) mampu menghambat pertumbuhan *Xoo* pada pengamatan hari ke-2, ke-4, dan ke-6 dimana zona penghambatan tertinggi ada di kitosan konsentrasi 300 ppm. Penelitian lain oleh Praveen et al. (2022) menunjukkan bahwa perendaman benih padi ke dalam nanopartikel kitosan konsentrasi mulai dari 5 mg/mL atau 0,5%; 10 mg/mL (1%); 15 mg/mL (1,5%); 20 mg/mL (2%); dan 25 mg/mL (2,5%) mampu mengurangi gejala penyakit hawar daun bakteri padi pada perlakuan di dalam *greenhouse* dan mampu menghambat pertumbuhan *Xoo* secara in vitro.

Aktivitas antibakteri nanopartikel pernah dievaluasi menggunakan uji mikrodilusi berbasis resazurin terstandarisasi untuk menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) terhadap patogen hawar daun bakteri *Xoo*. Hasil uji menunjukkan bahwa dari konsentrasi 2 hingga 512 $\mu\text{g/mL}$ terjadi penghambatan terhadap aktivitas metabolisme bakteri *Xoo* oleh nanopartikel kitosan di konsentrasi 128 (0,0128%), 256 (0,0256%), dan 512 $\mu\text{g/mL}$ (0,0512%) dibandingkan kontrol dan kitosan. Kitosan dalam semua konsentrasi tersebut tidak menunjukkan adanya penghambatan terhadap aktivitas metabolisme bakteri *Xoo*. Aktivitas yang diamati terhadap *Xoo* konsisten dengan kerentanan bakteri gram-negatif, dimana membran luar bakteri gram ini kaya akan lipopolisakarida bermuatan negatif sehingga terjadi interaksi elektrostatis yang kuat dengan nanopartikel kationik (Rahaeng & Orintara, 2026).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa konsentrasi penghambatan baik larutan kitosan maupun nanopartikel kitosan sangat bervariasi dan berbeda-beda meskipun terhadap bakteri yang sejenis. Tujuan utama penelitian adalah untuk mengetahui konsentrasi larutan nanopartikel kitosan yang optimal sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secara in vitro. Selain itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya perbedaan penghambatan antara larutan kitosan dan nanopartikel kitosan, serta untuk melihat ada tidaknya pengaruh kenaikan selisih angka kecil konsentrasi larutan nanopartikel kitosan terhadap efek penghambatannya.

METODE PENELITIAN

Preparasi Kultur *Xoo*

Strain *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* diperoleh dari koleksi kultur laboratorium Sekolah Pasca Sarjana, jurusan Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Strain ini merupakan hasil isolasi tanaman padi varietas ciherang dari Magelang, Jawa Tengah. Stock strain bakteri *Xoo* ditumbuhkan menggunakan medium *peptone sucrosa agar* (PSA) padat dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 3 hari guna aktivasi *Xoo*. Medium PSA padat (pH 7,0) per liter terdiri dari 5 g *peptone*; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g K_2PO_4 ; 20 g *sucrose*, yang ditambahkan 15 g agar dan dilarutkan serta di autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit.

Preparasi Larutan Nanopartikel Kitosan Berbagai Konsentrasi dengan Metode Gelasi Ion

Larutan nanopartikel kitosan dibuat menggunakan metode Gelasi Ion (Kusumastuti, 2017). Larutan nanopartikel kitosan dibuat melalui pelarutan larutan kitosan 0,1% (1 g serbuk kitosan per 1000 mL air steril) dalam asam asetat 1% (v/v) menggunakan stirer selama 2-3 jam hingga homogen pada suhu ruang. Selanjutnya 125 μL larutan Tween 80 ditambahkan

ke dalam larutan kitosan 0,1% dan distirer selama 30 menit, kemudian secara bertahap ditambahkan larutan TPP (*sodium Tripolyphosphate*) dan distirer kembali selama 1 jam. Perbandingan volume larutan kitosan dan larutan TPP yaitu 5 : 2. Konsentrasi dibuat mulai dari 0,06% hingga 0,1% dimana konsentrasi optimasi pertama antara lain 0,06%; 0,07%; 0,08%; 0,09%; dan 0,1%. Konsentrasi yang lebih optimal dioptimasi kedua, kemudian konsentrasi yang paling optimal dioptimasi ketiga dengan kenaikan interval konsentrasi 0,005.

Uji Antibakteri Nanopartikel Kitosan terhadap Bakteri *Xoo*

Isolat *Xoo* umur 48 jam dalam medium PS cair distandardisasi hingga 10^6 cfu/mL ($OD_{600} = 0,5$) dengan penambahan larutan *peptone salt*. Peptone salt (1000 mL) dibuat dari campuran 1 g *peptone* dan 8,59 g NaCl kemudian digunakan untuk menghitung cfu *Xoo*. Pada uji ini digunakan bakteri *Xoo* dengan OD 0,5 atau setara dengan jumlah koloni $\pm 242 \times 10^6$ cfu berdasarkan perhitungan. Medium PSA 100 mL steril yang masih cair, ditunggu hingga suhu mencapai 37°C atau hangat. Suspensi bakteri sejumlah 1 mL dipipet dan dicampurkan merata ke dalam 100 mL medium PSA hangat dan kemudian medium dituang ke dalam 5 petri steril dan dibiarkan kenyal. *Paper disc* steril diameter 7 mm ditetesi dengan 0,1 mL akuades steril (kontrol 1), asam asetat 1% (kontrol 2), larutan kitosan (CN), dan larutan nanopartikel kitosan (CNP) secara terpisah kemudian dibiarkan mengering, selanjutnya diletakkan di medium PSA. Petri kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Diameter zona hambat (pada jarak cm dari *paper disc*) diukur pada hari ke-2, 4, dan 6 setelah perlakuan. Ulangan perlakuan sebanyak 3x. Data dianalisis menggunakan variansi ANOVA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Larutan Nanopartikel Kitosan Berbagai Konsentrasi dengan Metode Gelasi Ion

Metode Gelasi Ion adalah metode untuk membentuk nanopartikel melalui interaksi ionik antara rantai kitosan yang bermuatan positif dan polianion sebagai pengikat (Primaningtyas et al., 2017). Metode gelasi ion merupakan metode yang paling banyak digunakan karena ringan, bebas pelarut, dan ramah lingkungan (Rahaeng & Oraintara, 2026). Pelarut asam asetat 1% (pH 2,82) digunakan karena kitosan mempunyai pKa sekitar 6,3-6,6 dan mudah larut dalam larutan asam. Lingkungan asam menyebabkan gugus $-NH_2$ pada molekul kitosan terprotonisasi menjadi $-NH_3^+$. *Sodium tripolyphosphate* (TPP) digunakan sebagai polianion. TPP merupakan agen pengikat silang ion yang paling banyak digunakan karena sifatnya yang tidak beracun dan multivalen (Cakir et al., 2021). Saat larutan *sodium tripolyphosphate* (TPP) ditambahkan ke dalam dispersi kitosan, maka ion TPP dapat berikatan dengan gugus amino terprotonisasi, baik antar rantai kitosan yang sama maupun rantai polimer yang berbeda (Primaningtyas et al., 2017). Ketika kitosan bermuatan kationik ditambahkan dengan larutan polianionik secara tetes demi tetes sambil diaduk terus menerus maka akan terbentuk partikel hidrogel bulat yang disebut nanopartikel kitosan. Pembentukan nanopartikel kitosan metode gelasi ion dipengaruhi oleh berat molekul kitosan, derajat deasetilasi dan konsentrasi kitosan, jenis dan jumlah agen pengikat, prosedur pencampuran, serta kondisi pencampuran seperti pH dan suhu (Warsito & Agustiani, 2021).

Menurut Penelitian oleh Kusumastuti (2017) nanopartikel kitosan dengan ukuran 175,3 nm dapat diperoleh dengan menggunakan larutan kitosan 0,2% dan ukuran nanopartikel lebih kecil dapat diperoleh dari larutan kitosan < 0,2%, sehingga pada penelitian ini digunakan larutan kitosan 0,1%. Ukuran partikel mempengaruhi penyebaran materi saat diaplikasikan, materi dengan ukuran partikel yang lebih kecil akan lebih efektif daripada

materi dengan ukuran besar (Manikandan & Sathiyabama, 2015). Rasio antara luas permukaan dan volume dalam bentuk nanopartikel membuat suatu materi lebih reaktif (Primaningtyas et al., 2017).

Larutan Tween 80 berfungsi sebagai surfaktan. Surfaktan digunakan untuk menstabilkan dispersi partikel dengan mencegah aglomerasi nanopartikel. Aglomerasi tidak akan terjadi karena nanopartikel kitosan-TPP tertutup dan distabilkan oleh molekul surfaktan (Primaningtyas et al., 2017). Konsentrasi yang digunakan mulai dari 0,06% karena pada konsentrasi < 0,06% yang dibuat menggunakan metode dalam penelitian ini, larutan mengalami aglomerasi/agregasi/penggumpalan setelah didiamkan beberapa jam meskipun sudah ditambahkan surfaktan.

Aglomerasi larutan nanopartikel kitosan dapat disebabkan oleh kecepatan pengadukan. Kecepatan pengadukan yang lebih tinggi, sekitar 1000 rpm, menyebabkan agregasi partikel karena pengadukan yang intens dapat menghancurkan gaya tolak antar partikel. Aglomerasi juga dapat disebabkan oleh suhu pengadukan. Suhu pengadukan yang lebih tinggi menyebabkan larutan mudah untuk menggumpal (Warsito & Agustiani, 2021). Zeta potensial nanopartikel kitosan di atas ambang batas ± 30 mV sebagai koloid yang cukup stabil sehingga kemungkinan kecil mengalami aglomerasi dan destabilisasi. Perbandingan konsentrasi kitosan dan TPP akan berpengaruh terhadap zeta potensial. Penelitian oleh de Pinho Neves et al. (2014) menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi kitosan dan TPP dapat meningkatkan zeta potensial.

Uji In Vitro Antibakteri larutan Kitosan dan Nanopartikel Kitosan terhadap Bakteri *Xoo*

Data diameter zona hambat pada uji in vitro pertama (**Tabel 1.**) menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat dari CN dan CNP 0,06% s/d 0,1% berbeda signifikan lebih besar dibandingkan kontrol air pada hari ke-2. Rata-rata diameter zona hambat CN maupun CNP 0,06% dan 0,08% berbeda signifikan lebih besar dibandingkan kontrol asam asetat 1%. Rata-rata diameter zona hambat yang paling berbeda secara signifikan lebih besar baik dibandingkan kontrol air maupun asam asetat 1% adalah CN 0,06%.

Tabel 1. Rata-rata diameter zona hambat CN dan CNP 0,06% s/d 0,1% terhadap pertumbuhan *Xoo* secara in-vitro

Variabel	pH	Rata-rata diameter zona hambat (cm)		
		hari ke-		
		ke-2	ke-4	ke-6
Kontrol Air	7	0,09 ^(a)	0 ^(aa)	0 ^(aaa)
K. Asam Asetat 1%	2,82	1,43 ^(c)	0,67 ^(bb)	0,59 ^(bbb)
CN 0,06%	2,96	1,73 ^(e)	0,65 ^(bb)	0,58 ^(bbb)
CN 0,07%	2,97	1,25 ^(c)	0,70 ^(bb)	0,63 ^(bbb)
CN 0,08%	2,97	1,63 ^(d)	0,95 ^(cc)	0,85 ^(ccc)
CN 0,09%	3	1,08 ^(b)	0,53 ^(aa)	0,45 ^(aaa)
CN 0,1%	3,14	1,1 ^(b)	0,35 ^(aa)	0,35 ^(aaa)
CNP 0,06%	3,30	1,68 ^(d)	0,75 ^(bb)	0,75 ^(ccc)
CNP 0,07%	3,32	1,05 ^(b)	0,65 ^(bb)	0,45 ^(aaa)
CNP 0,08%	3,31	1,58 ^(d)	1,05 ^(cc)	1 ^(ddd)
CNP 0,09%	3,36	1,08 ^(b)	0,55 ^(bb)	0,43 ^(aaa)
CNP 0,1%	3,44	0,73 ^(b)	0,25 ^(aa)	0,2 ^(aaa)

Keterangan : nilai rata-rata diameter zona hambat per hari pengamatan yang ditandai dengan huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan pada aras 0,05. K = kontrol, CN = *chitosan*, dan CNP = *chitosan nanoparticle*

Rata-rata diameter zona hambat CN dan CNP 0,08% paling berbeda signifikan lebih besar dibandingkan kontrol air maupun asam asetat 1% pada hari ke-4. Rata-rata zona hambat CN 0,08% dan CNP 0,06% berbeda signifikan lebih besar dibandingkan kontrol air maupun asam asetat 1%, sedangkan CNP 0,08% menunjukkan yang paling berbeda signifikan lebih besar dibandingkan kontrol air maupun asam asetat 1% pada hari ke-6.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua larutan baik kitosan maupun nanopartikel kitosan menunjukkan adanya kemampuan anti-bakteri. Beberapa penelitian terdahulu menyatakan bahwa aktivitas antibakteri kitosan dalam lingkungan asam dapat disebabkan oleh struktur polikationiknya akibat protonisasi $-NH_2$ pada posisi C-2 dari unit pengulangan D-glukosamin. Kitosan yang bermuatan positif dapat mengikat permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif dan mengganggu fungsi normal membran, misalnya dengan mendorong kebocoran komponen intraseluler atau dengan menghambat transportasi nutrisi ke dalam sel (Abdeltwab et al., 2019).

Konsentrasi yang paling optimal menghambat pertumbuhan bakteri *Xoo* hingga akhir pengamatan adalah CNP 0,08%. Larutan CN 0,08% mempunyai kemampuan penghambatan yang hampir sama dengan CNP 0,06% pada hari akhir pengamatan. Berdasarkan hasil penelitian dapat dikatakan bahwa larutan nanopartikel kitosan mempunyai kemampuan antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan larutan kitosan. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Abdeltwab et al. (2019) yang menyatakan bahwa nanopartikel kitosan menunjukkan tingkat penghambatan yang lebih tinggi terhadap bakteri *S.aureus* dan *L.monocytogenes* dibandingkan dengan kitosan. Nanopartikel kitosan memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan kitosan dan menunjukkan afinitas yang lebih tinggi terhadap sel bakteri, hal ini dapat menjadi penyebab aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan menjadi lebih tinggi (Qi et al., 2004).

Urutan nilai pH CN maupun CNP yang zona hambatnya signifikan dari yang paling rendah adalah CN 0,06% < CN 0,08% < CNP 0,06% < CNP 0,08% dengan angka $2,96 < 2,97 < 3,30 < 3,31$. Nanopartikel kitosan yang stabil dengan ukuran yang sesuai terbentuk pada pH 3,5. Nanopartikel kitosan pada pH 4,5-6,0 cenderung mengalami penurunan ukuran partikel dan zeta potensial sehingga terbentuk partikel yang relatif tidak stabil (Warsito & Agustiani, 2021). Larutan dengan pH paling mendekati pH yang sesuai untuk pembentukan nanopartikel kitosan adalah CNP 0,06% dan CNP 0,08%. Hal ini dapat menjadi salah satu faktor kemampuan antibakteri kedua larutan tersebut lebih optimal. Pertumbuhan *Xoo* pada uji penelitian ini paling bagus terjadi pada kontrol air yang mempunyai pH 7. Menurut Gomathi (1991), pH yang mendukung pertumbuhan maksimum *Xoo* adalah 7, sedangkan *Xoo* gagal tumbuh pada pH 3-4 dan 9-10. Larutan asam asetat 1% yang diuji sebagai kontrol mempunyai pH 2,82, sehingga penghambatan pertumbuhan *Xoo* pada kontrol asam asetat 1% dapat disebabkan karena pH larutan yang tidak mendukung untuk pertumbuhan *Xoo*.

Optimasi kedua dilakukan dengan uji in vitro aktivitas antibakteri CNP yang hanya dilakukan pada konsentrasi 0,06% dan 0,08%. Hasil pengukuran diameter zona hambat (**Tabel 2.**) menunjukkan bahwa CNP 0,06% dan 0,08% berbeda signifikan lebih kecil dibandingkan kontrol asam asetat 1%, tetapi ketiganya berbeda signifikan lebih besar apabila dibandingkan dengan kontrol air.

Tabel 2. Rata-rata diameter zona hambat CNP 0,06% dan 0,08% terhadap pertumbuhan *Xoo* secara in-vitro

Variabel	Rata-rata diameter zona (cm) hari ke-		
	ke-2	ke-4	ke-6
Kontrol Air	0 ^(a)	0 ^(aa)	0 ^(aaa)
K. Asam Asetat	0,7 ^(c)	0,5 ^(cc)	0,5 ^(ccc)
CNP 0,06%	0,5 ^(b)	0,37 ^(bb)	0,33 ^(bbb)
CNP 0,08%	0,37 ^(b)	0,27 ^(bb)	0,27 ^(bbb)

Keterangan : nilai rata-rata diameter zona hambat per hari pengamatan yang ditandai dengan huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan pada aras 0,05. K = kontrol, CNP = *chitosan nanoparticle*

Kemampuan daya hambat CNP 0,06% dan 0,08% terhadap pertumbuhan *Xoo* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, namun angka rata-rata diameter zona hambat CNP 0,06% lebih besar di setiap hari pengamatan (**Tabel 2**). Oleh karena itu, konsentrasi CNP yang diuji untuk optimasi ketiga adalah 0,06%, dengan kenaikan angka 0,005 untuk mendapatkan konsentrasi yang paling optimal. Hasil uji penghambatan CNP 0,06% dan 0,065% terhadap *Xoo* dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Rata-rata diameter zona hambat CNP 0,06% dan 0,065% terhadap pertumbuhan *Xoo* secara in-vitro

Variabel	Rata-rata diameter zona (cm) hari ke-		
	ke-2	ke-4	ke-6
Kontrol Air	0 ^(a)	0 ^(aa)	0 ^(aaa)
K. Asam Asetat 1%	1,88 ^(b)	0,58 ^(bb)	0,43 ^(ccc)
CNP 0,06%	1,40 ^(b)	0,28 ^(aa)	0,25 ^(bbb)
CNP 0,065%	1,53 ^(b)	0,3 ^(aa)	0,25 ^(bbb)

Keterangan : nilai rata-rata diameter zona hambat per hari pengamatan yang ditandai dengan huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan pada aras 0,05. K = kontrol, CNP = *chitosan nanoparticle*.

Hasil pengamatan (**Tabel 3.**) menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat pada CNP 0,06% dan 0,065% tidak berbeda secara signifikan dibandingkan kontrol asam asetat 1%, terutama pada hari ke-2, sedangkan pada hari ke-4 dan ke-6, kontrol asam asetat 1% menunjukkan perbedaan signifikan lebih besar dibandingkan CNP 0,06% dan 0,065%. Apabila CNP 0,06% dan 0,065% dibandingkan maka hasil rata-rata diameter zona hambatnya tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan kecil interval konsentrasi pada penelitian ini tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap kemampuan antibakterinya. Larutan CNP pada 0,065% diperoleh ukuran 150,2 nm berdasarkan uji PSA (*Particle Size Analyzer*).

Kemampuan aktivitas antibakteri larutan nanopartikel kitosan baik pada optimasi kedua maupun ketiga rata-rata menunjukkan penurunan kemampuan dibandingkan optimasi pertama. Hal ini dapat terjadi karena larutan yang digunakan berada dalam tahap penuaan atau tahap agregasi. Dispersi nanokitosan yang disimpan dalam jangka panjang menyebabkan partikel akan berada pada 3 tahap perubahan ukuran partikel antara lain tahap instan, penuaan, dan agregasi. Tahap instan merupakan tahap 3 hari setelah sintesis nanokitosan, dimana ukuran partikel menurun dalam waktu singkat. Tahap penuaan merupakan tahap dimana ukuran partikel cenderung tetap yang terjadi pada hari ke-7 hingga 14. Tahap agregasi terjadi pada hari ke-28 dimana partikel mengalami agregasi karena partikel saling menempel dan membentuk partikel yang lebih besar (Tsai et al., 2011).

Menurut penelitian oleh Primaningtyas et al. (2017) menunjukkan bahwa aglomerasi partikel terjadi pada pengamatan yang dilakukan selama 28 hari penyimpanan. Aglomerasi nanopartikel terjadi setelah 14 hari penyimpanan dimana partikel menjadi lebih besar dan distribusi ukuran partikel lebih lebar. Hal ini dapat disebabkan karena lemahnya interaksi kompleks di antara rantai ester sorbitan kitosan. Interaksi ini meliputi interaksi antara gugus hidrofilik kepala surfaktan dan $-NH_2$, $-NH_3^+$, atau $-OH$ pada kitosan serta antara hidrofobik ekor surfaktan dan tulang punggung kitosan. Komplek tersebut mencegah agregasi partikel, karena kompleks menjadi lemah maka interaksi kitosan dengan surfaktan tidak bertahan lama dan agregasi terjadi. Penambahan NaCl ke dalam larutan nanopartikel kitosan dapat mengurangi koagulasi nanopartikel yang ditandai oleh reduksi ukuran partikel selama 28 hari penyimpanan. Reduksi ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel lebih sempit dengan penambahan NaCl bahkan hingga 141 hari penyimpanan. Hal ini dapat terjadi karena penambahan NaCl dapat meningkatkan stabilisasi elektrostatis dan menghambat ikatan silang rantai antara partikel.

PENUTUP

Konsentrasi larutan nanopartikel kitosan yang optimal sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Xoo* pada penelitian ini adalah konsentrasi 0,06% dan 0,08% untuk optimasi pertama. Kemampuan antibakteri larutan nanopartikel kitosan lebih baik daripada larutan kitosan. Optimasi kedua menunjukkan konsentrasi larutan nanopartikel kitosan 0.06% lebih baik dibandingkan 0,08% meskipun tidak berbeda secara signifikan, namun mengalami penurunan aktivitas dibandingkan asam asetat sebagai pelarut apabila larutan yang digunakan tidak dibuat baru. Kenaikan kecil interval konsentrasi optimasi ketiga pada penelitian ini tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan terhadap kemampuan antibakterinya.

Aplikasi nanopartikel kitosan dapat menjadi alternatif yang lebih baik untuk mengatasi penyakit hawar daun bakteri yang disebabkan oleh *Xoo*, namun sangat perlu diperhatikan beberapa faktor yang dapat berpengaruh terhadap kemampuan antibakterinya dalam pengaplikasian, terutama cara pembuatan, penentuan konsentrasi yang optimal, dan juga lama penyimpanan larutan. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam penelitian serupa adalah pentingnya pengaturan kecepatan saat pengadukan serta pengukuran suhu dan pH dalam pembuatan larutan, penambahan agen pencegah aglomerasi larutan, serta pengukuran zeta potensial dan distribusi ukuran partikel.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Abdeltwab, W. M., Abdelaliem, Y. F., Metry, W. A., & Eldeghedy, M. (2019). Antimicrobial effect of Chitosan and Nano-Chitosan against some Pathogens and Spoilage Microorganisms Synbiotic dairy products View project Antimicrobial effect of Chitosan and Nano-Chitosan against some Pathogens and Spoilage Microorganisms. Core.Ac.UkWM Abdeltwab, YF Abdelaliem, WA Metry, M EldeghedyJournal of Advanced Laboratory Research in Biology, 2019•core.Ac.Uk, 10(1), 8–15.
- Alqahtani, F., Aleanizy, F., Tahir, E. El, Alhabib, H., Alsaif, R., Shazly, G., Alqahtani, H., Alsarra, I., & Mahdavi, J. (2020). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles against pathogenic n. Gonorrhoea. International Journal of Nanomedicine, 15, 7877–7887.

Cakir, M. A., F. Tornuk, dan N.C. Icyer (2021). Synthesis of Chitosan Nanoparticles with Ionic Gelation Method. International Conference on Innovative Engineering Applications. ISBN: 978-625-00-0123-3, 544-549.

de Pinho Neves, A.L., C. C. Milioli, L. Müller, H. G. Riella, N. C. Kuhnen, dan H. K. Stulzer (2014) "Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique" Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 445, 34–39.

Dewi, R.S., T.S. Kadir, dan B. Nuryanto. 2015. Deteksi Tular Benih *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan Hubungan Tingkat Keparahan Penyakit dengan Tingkat Infeksi Pad Benih Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Kementerian Pertanian. Subang, 449-458.

Gomathi, N. 1991. Studies on *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Ishiyama) the incidence of rice bacterial blight disease with specific reference to pathotypes of Tamil Nadu. M. Sc. (Agri.). Thesis. Tamil Nadu Agric. Univ. Coimbatore (India).

Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *Ac ce p te cr t. International Journal of Biological Macromolecules*. 77, 36-51.

Kusumastuti, Y. (2017). THE EFFECT OF TEMPERATURE AND CHITOSAN CONCENTRATION DURING STORAGE ON THE GROWTH OF CHITOSAN NANOPARTICLE PRODUCED BY IONIC GELATION METHOD. 080001.

Li, B., Liu, B., Shan, C., Ibrahim, M., Lou, Y., Wang, Y., Xie, G., Li, H., & Sun, G. (2013). Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak. (August 2012), 312–320.

Manikandan, A., & Sathiyabama, M. (2015). Green Synthesis of Copper-Chitosan Nanoparticles and Study of its Antibacterial Activity *Nanomedicine & Nanotechnology*. 6(1), 1–5.

Modina, I., Calibo, C., & Borines, L. (2009). Antimicrobial property of chitosan and induction of systemic acquired resistance for the control of rice bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Swings et al.). *Annals of Tropical Research*, 89, 69–89.

Praveen, N., Gowda, S. C., Narasimha, K., & Srinivas, C. (2022). Efficacy of Chitosan Nanoparticles Against Bacterial Leaf Blight of Rice Caused by *Xanthomonas oryzae* Pv. *oryzae*. *The Mysore Journal of Agricultural Sciences Mysore J. Agric. Sci*, 56(3), 211–221.

Primaningtyas, A., Budhijanto, W., Fahrurrozi, M., & Kusumastuti, Y. (2017). The effects of surfactant and electrolyte concentrations on the size of nanochitosan during storage. *AIP Conference Proceedings*, 1840.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. 339, 2693–2700.

Rahaeng, K., & Oraintara, A. (2026). A Simple Ionic-Gelation Method for Chitosan Nanoparticle Synthesis and Standardized Protocols for Biological Safety Assessment:

Antibacterial Activity , Phytotoxicity , and Biocompatibility. 1–24.

Shcherban, A. B. (2023). Chitosan and its derivatives as promising plant protection tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, 27(8), 1010–1021.

Suryaningsih, A. S., Triwidodo, H., & Wiyono, S. (2023). Ketahanan Enam Galur Padi asal Petani terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae*) Resistance of Six Lines from Farmers against Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae*). 19.

Tsai, M. L., Chen, R. H., Bai, S. W., & Chen, W. Y. (2011). The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 756–761.

Warsito, M.F. & F. Agustiani (2021). A review on factors affecting chitosan nanoparticles formation. *IOP Conference Series:Materials Science and Engineering* 1011 012027.