

**Nanopartikel Kitosan dan Ekstrak Daun Bugenvil:
Karakterisasi dan Aplikasinya untuk Mengendalikan
Bean common mosaic virus strain Blackeye Cowpea**

Nanoparticles of Chitosan and Bougainvillea Leaf Extract:
Characterization and Its Application to Control
Bean common mosaic virus strain Blackeye Cowpea

Nisa Fadhila Islami¹, Tri Asmira Damayanti^{1*},
Sugeng Santoso¹, Akhiruddin²

¹Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

²Departemen Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor
Jalan Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

(diterima Desember 2023, disetujui Mei 2024)

ABSTRAK

Kitosan dan ekstrak kasar daun bugenvil diketahui mampu mengendalikan beberapa virus tanaman termasuk *Bean common mosaic virus* strain Blackeye Cowpea (BCMV-BIC). Untuk mengurangi penggunaan bahan baku dan peningkatan keefektifan juga stabilitasnya, kedua bahan perlu disintesis menggunakan teknologi nanopartikel (NP). Penelitian bertujuan menyintesis nanopartikel kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasinya menggunakan modifikasi metode gelasi ionik, mengarakterisasi NP dan mengevaluasi potensi NP untuk mengendalikan BCMV-BIC pada tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor*. Nanopartikel kitosan (Kit-NP), ekstrak daun bugenvil (EDB-NP), dan kombinasinya (KEDB-NP) berhasil disintesis dengan rata-rata ukuran partikel berturut-turut sebesar 99.72, 163.68, dan 221.42 nm berdasarkan pengamatan di bawah *transmission electron microscope* (TEM) dan berbentuk bola (*sferis*) berdasarkan hasil analisis *scanning electron microscope* (SEM). Hasil analisis *fourier transform infrared* (FTIR), KEDB-NP menunjukkan gugus fungsi berturut-turut hidroksil, alkena, amina, cincin aromatik, dan senyawa alifatik organohalogen. Daun *C. amaranticolor* yang diberi perlakuan Kit-NP, EDB-NP, KEDB-NP dan juga non-NP pada konsentrasi 100–800 ppm sebelum inokulasi virus menunjukkan jumlah rata-rata lesio lokal nekrotik (LLN) nyata lebih rendah dibandingkan kontrol tanaman sakit tanpa perlakuan dan tidak berbeda nyata antarkonsentrasi. Perlakuan NP dan non-NP sebelum inokulasi virus secara nyata memperpanjang periode inkubasi dan menekan pembentukan LLN dengan keefektifan 67.5%–100% dibandingkan dengan aplikasi setelah inokulasi virus. Di antara konsentrasi yang diuji, konsentrasi NP antara 100 dan 300 ppm yang diaplikasikan sebelum penularan virus menunjukkan paling efektif dalam menghambat pembentukan LLN. Sintesis EDB-NP, Kit-NP, dan KEDB-NP menggunakan sangat sedikit bahan baku, namun keefektifannya sebanding dengan bentuk non-NPnya dalam mengendalikan infeksi BCMV.

Kata kunci: inokulasiantang, gelasi ionik, karakterisasi, *Potyvirus*, nanostruktur

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680.
Tel: +62 251 8629364, Faks: +62 251 8629364, Surel: triadys@apps.ipb.ac.id.

ABSTRACT

Chitosan and bougainvillea crude leaf extract is known able to control viruses including *Bean common mosaic virus* strain *Blackeye Cowpea* (BCMV-BIC). To reduce the raw material usage and to increase their effectiveness and stability, it is necessary to formulate them using nanoparticle (NP) technology. The research aimed to synthesize nanoparticles of chitosan (Kit-NP), bougainvillea leaf extract (EDB-NP), and their combination (KEDB-NP) using modified ionic gelation method, characterized and evaluated the potential of NPs in controlling BCMV-BIC on indicator plant *Chenopodium amaranticolor*. Kit-NP, EDB-NP, and KEDB-NP were successfully synthesized, with characteristic average particle sizes of 99.72, 163.68, and 221.42 nm, respectively under TEM and have a spherical form under SEM. The FTIR analysis showed that KEDB-NP functional groups were hydroxyl, alkene, amine, aromatic ring, and organohalogen aliphatic compounds. *Chenopodium amaranticolor* leaves sprayed by those of NPs, as well as their non-NP treatment at a concentration of 100–800 ppm before virus inoculation showed an average number of necrotic local lesion (NLL) significantly lower than untreated control and was not significantly different among concentrations. Those treatments before virus inoculation significantly prolong the incubation period and reduced NLL formation with effectiveness ranging 67.5%–100% in compared with application after virus inoculation. The NPs concentrations between 100 and 300 ppm which is applied before virus inoculation showed the best effectiveness in inhibiting NLL formation. Those of NPs synthesized using greatly less amount of their bulk materials, but their effectiveness are comparable to their non-NP forms in controlling BCMV.

Keywords: challenge inoculation, characterization, ionic gelation, nanostructure, *Potyvirus*

PENDAHULUAN

Bean common mosaic virus (BCMV) merupakan virus penting yang menginfeksi tanaman kacang-kacangan, khususnya tanaman kacang panjang. Virus ini mampu ditularkan dan disebarkan oleh serangga vektor seperti kutudaun (*Aphis craccivora*) dan bersifat tular benih. Salah satu upaya pengendalian BCMV ialah dengan pemanfaatan ekstrak tanaman seperti ekstrak kasar daun bugenvil (*Bougainvillea spectabilis*), bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa*), jengger ayam (*Celosia cristata*), sambiloto (*Andrographis paniculata*), pagoda (*Clerodendrum paniculatum*), dan *Chenopodium amaranticolor* melalui mekanisme induksi ketahanan sistemik dan aktivitas antiviral (Kurnianingsih dan Damayanti 2012). Aplikasi kitosan dan ekstrak tanaman sebelum inokulasi virus terbukti mampu menurunkan tingkat keparahan penyakit dan titer virus. Salah satu ekstrak nabati yang memiliki potensi untuk dikembangkan bahan aktifnya untuk mengendalikan BCMV atau virus lainnya ialah daun bugenvil. Ekstrak tanaman bugenvil dilaporkan bersifat antiviral karena mengandung gen *bouganin antiviral protein* (BAP) dengan mekanisme

menghambat sintesis protein (Güller *et al.* 2018). Selain ekstrak tanaman, salah satu bahan yang dapat digunakan dalam penurunan tingkat keparahan penyakit adalah kitosan. Infeksi dan penularan BCMV melalui serangga vektornya dapat dikendalikan dengan kitosan melalui mekanisme penghambat aktivitas makan (*antifeedant*) dan antiviral (Megasari *et al.* 2019).

Ekstrak daun bugenvil dan kitosan dapat dikombinasikan dan diformulasikan untuk meningkatkan efisiensi aplikasi di lapangan dengan formulasi nanopartikel. Nanopartikel (NP) saat ini banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Nanopartikel dapat disintesis menggunakan dua pendekatan, yaitu metode *top-down* (pembentukan nanopartikel dari struktur yang lebih besar) dan *bottom-up* (pembentukan nanopartikel dengan mengatur molekul untuk membentuk struktur kompleks dengan sifat baru).

Penelitian bertujuan menyintesis nanopartikel kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasinya, serta menentukan waktu dan konsentrasi terbaik yang mampu mengendalikan infeksi BCMV-BIC. Penentuan waktu aplikasi dan konsentrasi NP terbaik dilakukan pada tanaman indikator *C. amaranticolor*.

Dalam penelitian ini sintesis nanopartikel kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasinya dilakukan menggunakan metode gelasi ionik. Metode gelasi ionik dipilih karena memiliki beberapa keunggulan, yaitu proses yang sederhana, tidak menggunakan pelarut organik, dan prosesnya dapat dikontrol dengan mudah (Samudra *et al.* 2021). Proses sintesis melibatkan proses sambung silang (*cross-linking*) antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalen.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi Bahan Aktif dan Sintesis Nanopartikel Ekstrak Daun Bugenvil (EDB-NP)

Daun bugenvil segar dikeringanginkan, kemudian dihaluskan dengan blender sampai menjadi bubuk. Bubuk daun bugenvil kemudian direndam dengan etanol 96% di ruang gelap selama 24 jam. Larutan daun bugenvil disaring menggunakan kertas Whatman nomor 1, lalu ekstrak etanol daun bugenvil dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga berbentuk pasta kental. Pasta yang diperoleh disimpan dalam kulkas pada suhu 4 °C hingga digunakan.

Sintesis nanopartikel ekstrak daun bugenvil merujuk metode Vifta *et al.* (2022) dengan modifikasi komposisi bahan. Nanopartikel dibuat dari 0.1 g ekstrak bahan aktif yang dilarutkan dalam etanol 70%. Larutan bahan aktif ekstrak daun bugenvil ditambahkan natrium alginat, dihomogenkan, kemudian ditambahkan kalsium klorida dan diaduk hingga homogen. Tahap terakhir, campuran larutan diultrasonikasi untuk memecah polimer menjadi partikel-partikel berukuran kecil (metode sintesis detail sedang dalam proses paten sederhana).

Sintesis Nanopartikel Kitosan (Kit-NP)

Pembuatan nanopartikel kitosan merujuk pada metode gelasi ionik menurut El Gamal *et al.* (2022) menggunakan sodium tripolifosfat (STPP- $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) sebagai reduktor. Nanopartikel dibentuk dengan mencampurkan kitosan dengan larutan STPP yang ditambahkan

secara berangsur-angsur sambil diaduk sampai homogen. Hasil yang didapatkan dari metode gelasi ionik kemudian diultrasonikasi untuk memecahkan molekul polimer menjadi partikel-partikel dengan ukuran yang lebih kecil.

Sintesis Nanopartikel Kitosan-Ekstrak Daun Bugenvil (KEDB-NP)

Pembuatan nanopartikel kitosan ekstrak daun bugenvil (KEDB-NP) merujuk pada metode gelasi ionik mengikuti metode Widayastama dan Kurniati (2021) dengan beberapa modifikasi pada prosesnya (metode sintesis sedang dalam proses paten sederhana).

Karakterisasi Nanopartikel

Karakterisasi Kit-NP, EDB-NP, dan KEDB-NP ditentukan berdasarkan ukuran dan morfologi partikel. Pengamatan bentuk dan ukuran NP dilakukan menggunakan *low resolution transmission electron microscope* (LR-TEM) (TEM Hitachi HT7700) dan morfologi NP menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) (SEM Hitachi SU3500) di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi (PPNN) di Institut Teknologi Bandung.

Gugus fungsi nanopartikel ditentukan menggunakan *fourier-transform infrared spectroscopy* (FTIR) di *Integrated Laboratory and Research Center* Universitas Indonesia (ILRC UI). FTIR spektroskopi (Thermofisher Scientific Nicolet™ iS50) digunakan untuk mendapatkan absorpsi atau emisi spektrum inframerah gugus fungsi dari kitosan ekstrak daun bugenvil. Gugus fungsi KEDB non-NP dan KEDB-NP ditentukan pada rentang bilangan gelombang sinar inframerah antara 4000–500 cm^{-1} (Rahmat dan Suwarno 2020). Interpretasi data FTIR dilakukan dengan merujuk pada pedoman Coates (2000).

Penyiapan dan Penanaman Tanaman Indikator *Chenopodium amaranticolor*

Tanaman indikator *C. amaranticolor* disemai pada medium tanah dan sekam dengan perbandingan 1:1 dan ditempatkan di rumah kaca hingga umur 20 hari. Bibit dipindah-tanam ke polibag berukuran 30 cm × 30 cm,

selanjutnya tanaman diberi pupuk NPK 0.6 g per tanaman dengan cara dikocor pada saat umur tanaman 2 minggu setelah tanam (MST) dan 6 MST. Pada umur 40–50 hari, tanaman siap untuk pengujian.

Perbanyak Inokulum BCMV-BIC

Inokulum tanaman kacang panjang dengan gejala mosaik yang digunakan merupakan koleksi Tri Asmira Damayanti di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman. Sumber inokulum yang digunakan telah dikonfirmasi dengan RT-PCR menggunakan primer universal yang mengodekan gen CI dan peruntukan DNA (data tidak ditampilkan), dan diperbanyak pada kacang panjang kultivar New Parade. Kacang panjang berumur 7 hari setelah tanam (HST), diinokulasi dengan BCMV-BIC secara mekanis mengikuti metode yang digunakan oleh Hamdayanty dan Damayanti (2014).

Penentuan Aplikasi dan Konsentrasi Nanopartikel Terbaik pada Tanaman Indikator

Penentuan waktu aplikasi dan konsentrasi terbaik Kit-NP, EDB-NP, dan KEDB-NP dilakukan dengan penyemprotan NP pada tanaman indikator *C. amaranticolor* sebelum dan setelah diinokulasi mekanis dengan virus. Perlakuan yang diuji ada 8, yaitu kontrol sehat (Kse), kontrol sakit (Ksa), kitosan (Kit), ekstrak daun bugenvil (EDB), kitosan-ekstrak daun bugenvil (KEDB), Kit-NP, EDB-NP, dan KEDB-NP. Setiap perlakuan mempunyai 8 taraf konsentrasi uji, yaitu 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, dan 800 ppm. Setiap perlakuan terdiri atas 10 daun sebagai ulangan.

Larutan Kit-NP, EDB-NP, dan KEDB-NP dilarutkan dalam akuades sesuai konsentrasi yang digunakan, kemudian ditambahi 0.5 mL surfaktan Agristick 0.05% (*alkilaril poliglikol eter*) dalam 1000 mL larutan NP atau Non-NP. Penambahan surfaktan pada larutan nanopartikel berfungsi sebagai bahan perata, pembasah, dan perekat yang bertujuan meningkatkan penyebaran larutan semprot secara merata dan memperkecil tegangan permukaan butiran cairan semprot.

Pengamatan

Peubah yang diamati ialah waktu inkubasi, tipe gejala, dan jumlah lesio lokal nekrosis (LLN) pada 10 hari setelah inokulasi (HSI) dan tingkat hambatan relatif (THR). THR ditentukan dengan formula:

$$\text{THR} = \frac{\Sigma \text{LLN Kontrol} - \Sigma \text{LLN Perlakuan}}{\Sigma \text{LLN Kontrol}} \times 100\%$$

Analisis Data

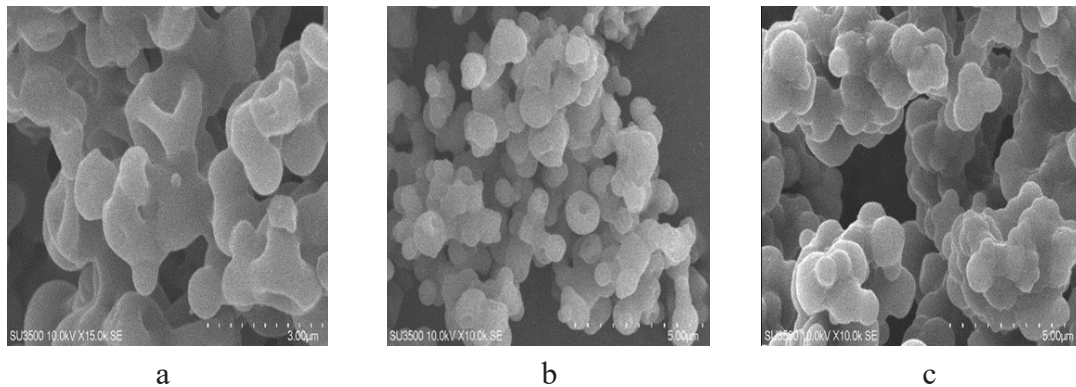
Percobaan ini disusun dalam rancangan acak lengkap. Data pengujian ditabulasi menggunakan perangkat lunak Microsoft Office Excel dan data yang diperoleh dianalisis sidik ragam *analysis of variance* (ANOVA) menggunakan perangkat lunak *statistical program for sosial science* (SPSS) 22. Perlakuan dengan pengaruh berbeda nyata dianalisis lanjut dengan uji Tukey pada taraf nyata 5%. Skor keparahan penyakit dianalisis secara non-parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Dunn* pada taraf 5% untuk perlakuan yang berbeda nyata.

HASIL

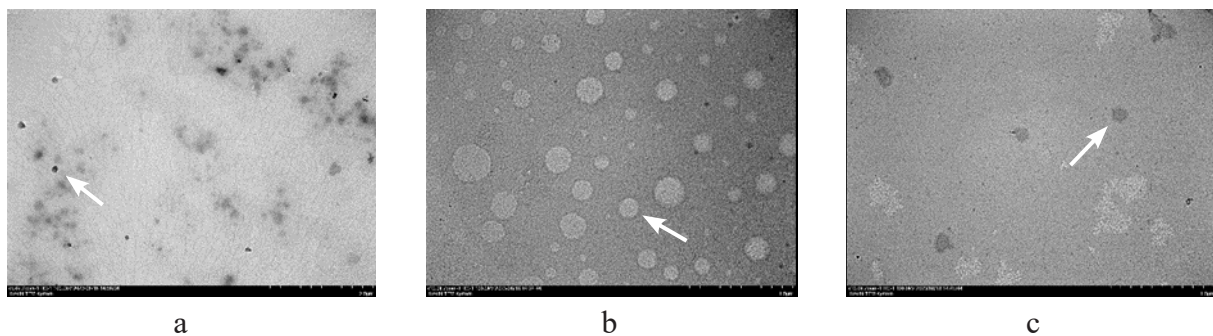
Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Ekstrak Daun Bugenvil

Nanopartikel kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasinya berhasil disintesis dengan metode gelas ionik. Berdasarkan pengamatan morfologi nanopartikel dengan SEM menunjukkan bahwa Kit-NP, EDB-NP, dan KEDB-NP berbentuk bulat menyerupai bola (*sferis*) (Gambar 1a-c). Hasil analisis dengan TEM mengonfirmasi hasil pengamatan menggunakan SEM. Rata-rata ukuran nanopartikel Kit-NP, EDB-NP, dan KEDB-NP berturut-turut ialah 99.72 nm, 163.68 nm, dan 221.42 nm (Gambar 2a-c).

Berdasarkan FTIR, gugus fungsi aktif pada larutan kitosan-ekstrak daun bugenvil non NP (KEDB) terdiri atas hidroksil (O–H), alkana (–CH₃), alkana (>CH₃), senyawa alifatik organohalogen (C–I), alkuna (C–H), nitrogen (–SCN), amina (>N–H) (Tabel 1) dan gugus fungsi pada larutan KEDB-NP menjadi hidroksil (O–H), amina (>NH), cincin aromatik (C–H), senyawa alifatik



Gambar 1 Morfologi nanopartikel a, kitosan (Kit-NP); b, ekstrak daun bugenvil (EDB-NP); dan c, kombinasinya (KEDB-NP) berdasarkan pengamatan menggunakan SEM. (Figure 1 Nanoparticles morphology of a, chitosan (Kit-NP); b, bougainvillea leaf extract (EDB-NP); and c, their combination (KEDB-NP) based on observation using SEM).



Gambar 2 Morfologi nanopartikel a, kitosan (Kit-NP); b, ekstrak daun bugenvil (EDB-NP); dan c, kombinasinya (KEDB-NP) berdasarkan pengamatan menggunakan TEM dengan perbesaran 10 000 \times . (Figure 2 Nanoparticles morphology of a, chitosan (Kit-NP); b, bougainvillea leaf extract (EDB-NP); and c, their combination (KEDB-NP) based on observation using TEM with 10 000 \times magnification).

organohalogen (C-I) (Tabel 2). KEDB non NP dan KEDB-NP menunjukkan puncak serapan yang sama pada gugus O-H, >NH, dan C-H yang merupakan gugus penyusun kitosan (Gambar 3a-b). Larutan KEDB memiliki tiga gugus -OH, C-H, dan karbonil yang menjadi struktur penyusun daun bugenvil. Larutan KEDB-NP memiliki gugus O-H dan C-H yang sama dengan struktur penyusun ekstrak daun bugenvil.

Keefektifan Kitosan, Ekstrak Daun Bugenvil, dan Kombinasi Nanopartikel dalam Menekan Infeksi BCMV-BIC

Berdasarkan hasil pengujian nanopartikel dan non-nanopartikel masing-masing perlakuan dengan cara aplikasi penyemprotan daun

sebelum inokulasi virus (SB) dan setelah inokulasi virus (ST) menunjukkan waktu inkubasi yang berbeda-beda. Perlakuan nanopartikel dan non-nanopartikel menunjukkan waktu inkubasi yang lebih lama dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan terinfeksi virus. Gejala pada tanaman kontrol sakit tanpa perlakuan muncul 4 hari setelah inokulasi, sedangkan pada perlakuan kitosan, EDB, KEDB nanopartikel dan non-nanopartikel sebelum dan setelah diinokulasi BCMV-BIC menunjukkan waktu inkubasi yang nyata lebih lama, yaitu 5 dan 6 hari setelah inokulasi.

Rata-rata LLN pada tanaman indikator *C. amaranticolor* menunjukkan perlakuan nanopartikel setelah inokulasi BCMV-BIC nyata lebih banyak dibandingkan dengan

Tabel 1 Profil spektroskopik FTIR* dari KEDB
(Table 1 FTIR* spectroscopic profile of KEDB)

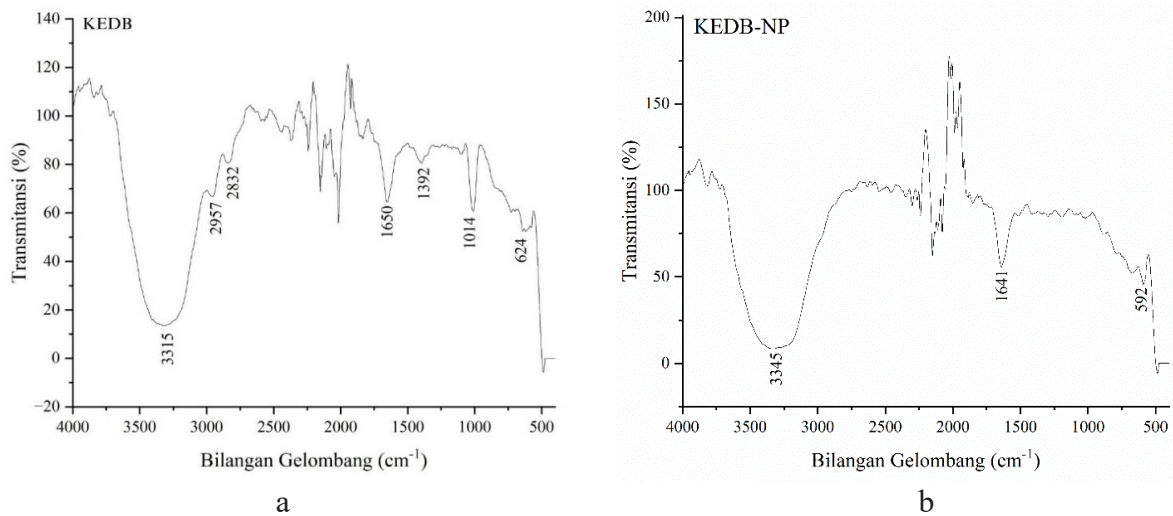
Bilangan gelombang (Wavenumber) cm ⁻¹	Ikatan (Bond)	Tipe vibrasi (Vibration type)	Gugus fungsi (Functional group)	Frekuensi gugus (Cluster frequency)
3315	O–H	Peregangan (Stretch)	Hidroksil (Hydroxyl)	3400–3200
2975	–CH ₃	Peregangan (Stretch)	Alkana/alkil (Alkane)	2975–2950
2832	–CH ₃	Peregangan (Stretch)	Alkana/alkil (Alkane)	2850–2815
2370	-	-	-	-
2238	C–I	Peregangan (Stretch)	Senyawa organohalogen alifatik (Aliphatic organohalogen compounds)	2260–2190
2147	C≡C	Tekuk (bend)	Alkuna (Alkynes)	2140–2100
2014	–SCN	-	Nitrogen (Nitrogen)	2150–1990
1839	-	-	Senyawa karbonil (carbonyl compounds)	1850–1800
1650	>N–H	Tekuk (bend)	Amina (Amine)	1650–1550
1392	–CH ₃	Peregangan (Stretch)	Alkana/alkil (Alkane)	1395–1385
1014	>CH ₃	Peregangan (Stretch)	Alkana/alkil (Alkane)	1055–1000
624	C–H	Tekuk (bend)	Alkuna (Alkynes)	680–610

*FITR, *fourier transform infrared*.Tabel 2 Profil spektroskopik FTIR dari KEDB-NP
(Table 2 FTIR spectroscopic profile of KEDB-NP)

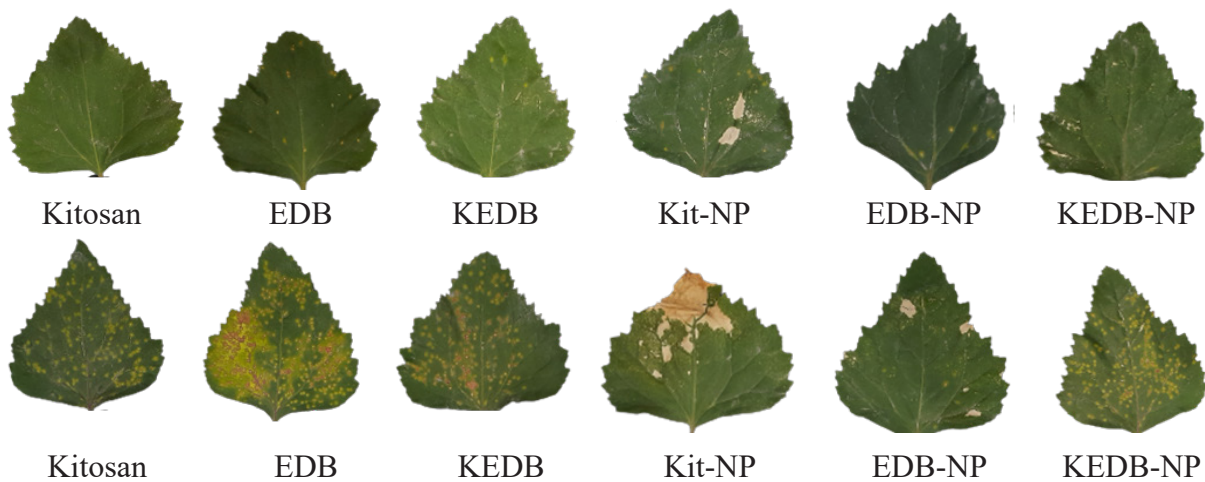
Bilangan gelombang (Wavenumber) cm ⁻¹	Ikatan (Bond)	Tipe vibrasi (Vibration type)	Gugus fungsi (Functional group)	Frekuensi gugus (Cluster frequency)
3285	O–H	Peregangan (Stretch)	Hidroksil (Hydroxyl)	3400–3200
2142	O–H	Peregangan (Stretch)	Alkena (Alkene)	2140–2100
1632.80	>N–H	Tekuk (bend)	Amina (Amine)	1650–1550
689	C–H	Tekuk (bend)	Cincin aromatik (Aromatic ring/Aryl)	900–670
592	C–I	Peregangan (Stretch)	Senyawa alifatik organohalogen (Aliphatic compounds organohalogen)	600–500

perlakuan nanopartikel sebelum inokulasi BCMV-BIC (Gambar 4). Rata-rata jumlah LLN pada daun yang diberikan perlakuan sebelum inokulasi BCMV berkisar 0–30.6, sedangkan pada perlakuan setelah diinokulasi BCMV berkisar 0–190.1 (Tabel 3). Seluruh perlakuan sebelum inokulasi virus menunjukkan jumlah LLN tidak berbeda nyata dibandingkan dengan tanaman sehat dan tingkat hambatan relatif perlakuan sebelum inokulasi virus berkisar 67.5%–100% (Tabel 4).

Daun yang disemprot dengan nanopartikel dan non-nanopartikel sebelum inokulasi virus menunjukkan tipe gejala lesio lokal *pin point* dengan halo kuning yang mengitari bagian daun yang telah nekrotik. Sementara itu pada daun yang disemprot nanopartikel dan non-nanopartikel setelah inokulasi virus menunjukkan selain lesio lokal yang lebih besar dengan halo kuning yang mengitari bagian nekrotik, juga terdapat warna kemerahan di sekeliling nekrotik daun (Gambar 4).



Gambar 3 Spektrogram FTIR KEDB. a, Non-NP; dan b, KEDB-NP. (Figure 3 FTIR spectrogram of KEDB. a, Non-NP; and b, KEDB-NP).



Gambar 4 Gejala lesio lokal nekrotik pada tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* yang diberi perlakuan NP dan non-NP a, sebelum; dan b, sesudah inokulasi mekanis BCMV-BIC. (Figure 4 Symptoms of necrotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* as indicator plants for NP and non-NP treatments given a, before; and b, after mechanical inoculation of BCMV-BIC).

Tabel 3 Pengaruh perlakuan nanopartikel kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasinya terhadap rata-rata lesio lokal nekrotik pada tanaman indikator (*Chenopodium amaranticolor*)
(Table 3 Effect of nanoparticle treatment of chitosan, bougainvillea leaf extract, and their combination on the average local necrotic lesions on indicator plants (*Chenopodium amaranticolor*))

Perlakuan (Treatment)	Waktu inkubasi/ HSI (Incubation time/DAI)	Rata-rata jumlah lesio lokal nekrotik (Average number of necrotic local lessions)							
		100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm	600 ppm	700 ppm	800 ppm
Kontrol tanaman sehat (Healthy plant as control)	-	0.0 d*	0.0 f	0.0 d	0.0 ef	0.0 e	0.0 c	0.0 e	0.0 c
Kontrol tanaman sakit (Diseased plant as control)	4.0 a	42.8 ab	42.8 abcde	42.8 ab	42.8 ab	42.8 ab	42.8 a	42.8 abc	42.8 a
Sebelum inokulasi virus (Before virus inoculation)									
Kitosan	6.0 c	0.0 d	1.4 cdef	-**	2.7 bcdef	1.7 cde	-	0.4 de	-
EDB	6.0 c	0.4 cd	5.1 bcdef	3.1 bcd	0.8 cde	0.4 de	5.7 ab	1.8 cde	0.3 bc
KEDB	6.0 c	1.1 cd	0.4 f	1.3 cd	1.3 cde	1.5 cde	1.0 bc	0.4 de	-
Kit-NP	6.0 c	0.0 d	5.5 bcdef	13.9 abcd	30.6 abcd	0.4 e	0.7 bc	0.3 de	-
EDB-NP	6.0 c	4.5 abcd	0.8 ef	0.0 d	0.0 ef	0.0 e	2.7 abc	0.0 e	0.0 c
KEDB-NP	6.0 c	2.6 bcd	1.5 def	0.16 cd	3.5 cde	2.1 bcde	0.2 bc	0.4 de	0.0 c
Setelah Inokulasi virus (After virus inoculation)									
Kitosan	5.0 b	96.6 a	65.5 abc	70.3 a	26.0 abc	26.9 abcd	12.4 abc	0.6 cde	-
EDB	5.0 b	2.4 bcd	190.1 a	93.6 a	18.3 abcd	104.9 a	71.3 a	16.3 abcd	21.7 ab
KEDB	5.0 b	28.0 ab	56.9 abcd	25.0 abc	9.4 abcde	1.3 cde	0.4 bc	0.0 e	0.0 c
Kit-NP	5.0 b	0.0 cd	1.5 def	2.5 bcd	1.0 def	0.8 cde	0.9 bc	0.85 bcde	-
EDB-NP	5.0 b	28.9 abc	1.3 ef	50.0 ab	59.4 a	18.2 abc	0.33 bc	108.2 a	32.1 a
KEDB-NP	5.0 b	42.5 ab	102.9 ab	34.3 abc	13.5 abcd	12.4 abcd	85.6 a	60.3 ab	39.7 a

KEDB, Kitosan ekstrak daun bugenvil; EDB, Ekstrak daun bugenvil; Kit-NP, Nanopartikel kitosan; KEDB-NP, Nanopartikel kitosan ekstrak daun bugenvil; EDB-NP, Nanopartikel ekstrak daun bugenvil; Ksa, Kontrol tanaman sakit tanpa perlakuan; dan Kse, Kontrol tanaman sehat tanpa perlakuan.

*Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji Kruskal Wallis dan uji lanjut Dunn pada taraf 5%.

**(-) tanaman mati.

(KEDB, Chitosan bougainvillea leaf extract; EDB, Bougainvillea leaf extract; Kit-NP, Chitosan nanoparticles; KEDB-NP, Bougainvillea leaf extract chitosan nanoparticles; EDB-NP, Bougainvillea leaf extract nanoparticles; Ksa, Diseased plant without treatment as treatment control; and Kse, Healthy plant without treatment as treatment control.

*Values followed by the same letter in the same column are not significantly different in the Kruskal Wallis test and Dunn's further test at the 5% level.

** (-) dead plants).

PEMBAHASAN

Pemanfaatan nanopartikel ekstrak daun bugenvil dan biosintesis nanopartikel perak dengan reduktor ekstrak *B. glabra* banyak dikaji untuk mengendalikan bakteri patogen pada manusia (Mehdi *et al.* 2021; Kenari

dan Razavi 2022). Namun, kajian tentang pemanfaatannya dalam mengendalikan patogen tumbuhan termasuk virus masih sedikit, khususnya di Indonesia. Ekstrak kasar daun bugenvil, kitosan, dan ekstrak daun pagoda telah terbukti mampu menekan keparahan penyakit dan titer beberapa virus tanaman

Tabel 4 Tingkat hambatan relatif (THR) perlakuan kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasi keduanya terhadap rata-rata lesio lokal nekrotik pada tanaman *Chenopodium amaranticolor* (Table 4 Relative inhibition Level (THR) of chitosan treatment, bougainvillea leaf extract, and their combination on the average necrotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* plants)

Perlakuan (Treatment)	Tingkat hambatan relatif lesio lokal nekrotik/THR (Relative inhibition level of necrotic local lesions/RIL (%))							
	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm	600 ppm	700 ppm	800 ppm
Kontrol tanaman sehat (Healthy plant as control)	100.0 a*	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
Kontrol tanaman sakit (Diseased plant as control)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sebelum inokulasi virus (Before virus inoculation)								
Kitosan	99.5 a	96.7 a	-**	90.7 a	92.5 a	-	99.1 a	-
EDB	98.3 a	88.1 a	92.7 a	99.3 a	99.3 a	86.7 a	96.3 a	99.3 a
KEDB	95.3 ab	98.3 a	96.9 a	96.9 a	96.5 a	96.3 a	99.3 a	-
Kit-NP	99.7 a	81.1 a	67.5 ab	28.5 c	99.1 a	98.4 a	99.3 a	-
EDB-NP	89.5 abc	98.4 a	100.0 a	99.8 a	99.5 a	94.8 a	99.1 a	99.5 a
KEDB-NP	93.9 ab	96.5 a	96.3 a	91.8 a	95.1 a	99.5 a	99.1 a	99.7 a
Setelah inokulasi virus (After virus inoculation)								
Kitosan	-125.7 e	-53.0 bc	-64.2 de	39.3 bc	37.2 b	73.8 a	98.6 a	-
EDB	94.4 ab	-344.2 d	-118.7 e	57.2 abc	-145.1 c	-102.1 b	51.4 b	49.3 b
KEDB	34.6 bcd	-32.9 b	41.6 abc	78.0 ab	95.1 a	99.1 a	100.0 a	100.0 a
Kit-NP	100.0 a	96.5 a	94.2 a	97.9 a	98.1 a	97.9 a	98.6 a	-
EDB-NP	32.5 cd	94.4 a	-16.8 cd	-38.8 d	57.5 ab	98.6 a	-152.8 d	32.5 b
KEDB-NP	0.7 d	-140.4 c	19.9 bc	68.5 abc	71.0 ab	-100.0 b	-40.9 c	7.2 b

KEDB, Kitosan ekstrak daun bugenvil; EDB, Ekstrak daun bugenvil; Kit-NP, Nanopartikel kitosan; KEDB-NP, Nanopartikel kitosan ekstrak daun bugenvil; dan EDB-NP, Nanopartikel ekstrak daun bugenvil.

*Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji Kruskal Wallis dan uji lanjut Dunn pada taraf 5%.

**(-) tanaman mati.

(KEDB, Chitosan bougainvillea leaf extract; EDB, Bougainvillea leaf extract; Kit-NP, Chitosan nanoparticles; KEDB-NP, Bougainvillea leaf extract chitosan nanoparticles; EDB-NP, Bougainvillea leaf extract nanoparticles; Ksa, Diseased plant without treatment as treatment control; and Kse, Healthy plant without treatment as treatment control.

*Values followed by the same letter in the same column are not significantly different in the Kruskal Wallis test and Dunn's further test at the 5% level.

**(-) dead plants).

(Kurnianingsih dan Damayanti 2012; Damayanti dan Panjaitan 2014; Damayanti *et al.* 2014; Putri dan Damayanti 2020; Pandawani *et al.* 2022). Penggunaan ekstrak kasar dalam skala 3 akan membutuhkan daun bugenvil yang banyak. Untuk meningkatkan efisiensi penggunaan ekstrak daun, kestabilan dan keefektifannya dalam penerapan skala lapangan maka formulasi nanopartikel menjadi teknologi yang dapat mengatasi kekurangan penggunaan ekstrak daun kasar ini.

Nanopartikel terbentuk sebagai hasil dari interaksi elektrostatik antara gugus positif amina dari kitosan dengan gugus negatif dari polianion pada tripolifosfat (Napsah dan Wahyuningsih 2014). Sodium tripolifosfat digunakan sebagai agens sambung silang pada reaksi gelas ionik; penambahan STPP menghasilkan pembentukan kompleks manik-manik seperti rantai yang terkait satu sama lain (Kunjachan *et al.* 2010).

Karakteristik nanopartikel menggunakan TEM, mampu menghasilkan pencitraan langsung dengan spektroskopi kristal. Pola difraksi elektron transmisi menentukan struktur kristalografi suatu material (Karlsson 2016). Karakteristik NP yang terbentuk hanya diperoleh untuk Kit-NP, yaitu berukuran < 100 nm; sedangkan untuk EDB-NP dan KEDB-NP diperoleh ukuran partikel yang lebih besar, yaitu berturut-turut 163.68 dan 221.42 nm. Karakteristik ukuran EDB-NP dan KEDB-NP yang berukuran > 100 nm masih dikategorikan sebagai nanopartikel. Menurut Medina *et al.* (2007), nanopartikel merupakan material berukuran < 1000 nm yang memiliki sifat fisikokimia spesifik yang berbeda dengan material besarnya (*bulk material*) dengan komposisi dan sifat yang sama. Ukuran dan dispersi nanopartikel kitosan dipengaruhi oleh banyak faktor seperti konsentrasi awal kitosan dan tripolifosfat, pH, waktu reaksi, kecepatan, suhu, dan durasi homogenisasi (Kunjachan *et al.* 2010).

Berdasarkan FTIR, KEDB-NP menunjukkan perubahan gugus fungsi dibandingkan gugus fungsi KEDB. Bilangan gelombang 1650 cm^{-1} yang merupakan gugus fungsi amino pada KEDB berubah menjadi 1641 cm^{-1} pada KEDB-NP dengan peningkatan transmitansi. Hal ini disebabkan adanya ikatan silang elektrostatis antara gugus fosfat dan ion $-\text{OH}$ dari STPP berinteraksi dengan gugus amino yang dimiliki oleh kitosan (Bhumkar dan Pokharkar 2006). Struktur kitosan memiliki beberapa gugus fungsi di antaranya gugus $-\text{OH}$, $\text{C}-\text{H}$ (sp^3), dan gugus $-\text{NH}_2$. Gugus $-\text{NH}_2$ merupakan gugus yang khas dari senyawa kitosan (Wafi *et al.* 2020).

Perlakuan NP sebelum penularan virus menunjukkan keefektifan tinggi. Namun, beberapa perlakuan NP sesudah penularan virus juga menunjukkan keefektifan yang tinggi dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan NP sebelum inokulasi virus. Hal ini menunjukkan bahwa EDB, KEDB, EDB-NP, Kit-NP dapat diaplikasikan baik sebelum atau sesudah infeksi virus tergantung konsentrasi. Pada konsentrasi EDB 100 ppm, KEDB 400–800 ppm, EDB-NP 200 dan 600 ppm

sesudah inokulasi virus efektif menekan pembentukan LLN $> 90\%$, namun perlakuan Kit-NP efektif pada konsentrasi 100–700 ppm. Keefektifan perlakuan NP sebelum dan sesudah infeksi virus mengindikasikan adanya induksi ketahanan dan aktivitas antiviral yang mampu menekan pembentukan lesio lokal. Namun, keefektifan penekanan LLN diatas 90% pada perlakuan yang diuji menunjukkan adanya aktivitas antiviral dari perlakuan NP dan non-NP yang diaplikasikan sebelum dan/atau sesudah penularan virus.

Nanopartikel meningkatkan resistensi tanaman dengan mengaktivasi mekanisme pertahanan tanaman atau melalui deaktivasi patogen (mikroba). Namun, perlu penelitian lebih lanjut terkait aktivitas enzim pertahanan yang terlibat dalam penelitian ini. Selain itu, nanopartikel sangat efektif sebagai agens antiviral yang mampu menghambat virus saat masuk sel atau replikasi virus dalam sel (Rajani *et al.* 2022), menginaktivasi dan mendenaturasi protein selubung dan asam nukleat virus (RNA atau DNA) dan protein lainnya (Warghane *et al.* 2024).

Nanopartikel kitosan memiliki bioreaktivitas yang kuat untuk mengikat RNA virus karena kitosan memiliki gugus fosfat bermuatan negatif dalam rantai utamanya (Mansilla *et al.* 2013). Kitosan NP melekat pada partikel virus, menghambat replikasi didalam sel yang terinfeksi dan meningkatkan imunitas, sistem pertahanan antioksidan (*antioxidant defense system*) serta meningkatkan resistensi tanaman dengan peningkatan aktivitas ribonuklease dan protease (Rendina *et al.* 2019; Nagorskaya *et al.* 2014)

Perlakuan EDB dan kitosan secara tunggal baik dalam bentuk kasar ataupun NP memiliki keefektifan yang sama dengan formula kombinasinya (KEDB dan KEDB-NP). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan kitosan dan EDB secara tunggal mampu menghambat infeksi BCMV-BIC pada tanaman indikator. Senyawa aktif yang dimiliki oleh EDB berupa fenolik dan flavonoid menunjukkan mampu menghambat pembentukan LLN akibat infeksi virus. Selain itu, EDB memiliki protein yang bersifat antiviral yang dikenal

sebagai bouganin; merupakan *ribosome-inactivating proteins* (RIPs) tipe 1 (Bortolotti *et al.* 2018). *Bougainvillea antiviral proteins* (BAPs) merupakan RIPs (Verma *et al.* 1998). Sifat antiviral RIPs tidak hanya disebabkan oleh penghambatan ribosom, tetapi juga interaksi langsung RIPs dengan RNA dan DNA virus (Barbieri *et al.* 1997; Parikh dan Tumer 2004). Bouganin dilaporkan mampu mencegah infeksi sistemik yang disebabkan oleh *Artichoke mottled crinkle virus* pada tanaman *Nicotiana benthamiana*, dengan menghentikan replikasi virus pada tempat infeksi terjadi (Bortolotti *et al.* 2018).

Aplikasi EDB-NP, Kit-NP, dan KEDB-NP menunjukkan kemampuan dalam mengendalikan infeksi virus dengan menghambat pembentukan LLN. Kitosan, ekstrak daun bugenvil, dan kombinasinya menunjukkan keefektifan yang tidak berbeda nyata dengan formulasi nanopartikelnya dalam menekan pembentukan lesio lokal nekrotik, khususnya pada perlakuan sebelum dan beberapa perlakuan sesudah infeksi virus. Hal ini mengindikasikan perubahan formulasi NP tidak nyata memberikan pengaruh terhadap kemampuan kitosan dan ekstrak daun bugenvil dalam mengendalikan virus, namun formulasi NP lebih sedikit dan efisien menggunakan bahan dasar (daun segar dan kitosan). Berdasarkan efisiensi penggunaan bahan pada konsentrasi NP antara 100 ppm dan 300 ppm yang disemprotkan sebelum penularan virus merupakan konsentrasi terbaik dalam menekan pembentukan lesio lokal nekrotik. Keefektifan NP pada tiga konsentrasi tersebut tidak berbeda nyata, mengindikasikan pada konsentrasi 100 ppm sudah cukup mampu menekan infeksi BCMV-BIC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai dari hibah Penelitian Tesis Magister (PTM), Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi dengan nomor kontrak 102/E5/PG.02.00.PL/2023 atas nama TAD untuk mendanai penelitian NFI.

DAFTAR PUSTAKA

- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. 2004. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 100(5):5–28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. 1997. Polynucleotide: Adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: Effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Research*. 25(3):518–522. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.3.518>.
- Bhumkar DR, Pokharkar VB. 2006. Studies on effect of ph on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientist*. 7(2):1–6. DOI: <http://doi.org/10.1208/pt070250>.
- Bortolotti M, Bolognesi A, Polito L. 2018. Review: Bouganin, an attractive weapon for immunotoxins. *Toxins*. 10(323): 1–10. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10080323>.
- Coates J. 2000. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Di dalam: Meyer RA, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester (GB): John Wiley & Sons Ltd. hlm 10815–10837.
- Damayanti TA, Panjaitan MT. 2014. Aktivitas antiviral beberapa ekstrak tanaman terhadap *Bean common mosaic virus* strain *Blackeye Cowpea* (BCMV-BIC) pada kacang panjang. *Journal of Tropical Pest and Diseases*. 14(1):32–40. DOI: <https://doi.org/10.23960/j.hppt.11432-40>
- Damayanti TA, Haryanto, Wiyono S. 2014. Pemanfaatan kitosan untuk pengendalian *Bean common mosaic virus* (BCMV) pada kacang panjang. *Journal of Tropical Pest and Diseases*. 13(2):110–116. DOI: <https://doi.org/10.23960/j.hppt.213110-116>.
- El Gamal AY, Atia MM, El Sayed T, Abou-Zaid MI, Tohamy MR. 2022. Antiviral activity of chitosan nanoparticles for controlling plant-infecting viruses.

- South African Journal of Science. 118(1–2):1–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.17159/sajs.2022/10693>.
- Güller A, Sipahioğlu HM, Usta M, Durak ED. 2018. Antiviral and antifungal activity of Biologically active recombinant bougainin protein from *Bougainvillea spectabilis* Willd. Journal of Agriculture Science. 24:227–237. DOI: <http://dx.doi.org/10.15832/ankutbd.446442>.
- Hamdayanty, Damayanti TA. 2014. Infeksi *Bean common mosaic virus* pada umur tanaman kacang panjang yang berbeda. Jurnal Fitopatologi Indonesia. 10(6): 181–187. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.10.6.181>.
- Jogaiah S, Satapute P, De Britto S, Konappa N, Udayashankar AC. 2020. Exogenous priming of chitosan induces upregulation of phytohormones and resistance against cucumber powdery mildew disease is correlated with localized biosynthesis of defense enzymes. International Journal of Biological Macromolecules. 162: 1825–1838. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.124>
- Karlsson L. 2016. Transmission electron microscopy of 2d materials: structure and surface properties [disertasi]. Linköping (SE): Linköping University.
- Kenari RE, Razavi R. 2022. Encapsulation of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) flower extract in *Urtica dioica* L. seed gum: characterization, antioxidant/antimicrobial properties, and in vitro digestion. Food Science and Nutrition. 10(10):3436–3443. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2944>.
- Kunjachan S, Jose S, Lammers T. 2010. Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques. Asian Journal of Pharmaceutics. 4:148–153. DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-8398.68467>.
- Kurnianingsih L, Damayanti TA. 2012. Lima ekstrak tumbuhan untuk menekan infeksi *Bean common mosaic virus* pada tanaman kacang panjang. Jurnal Fitopatologi Indonesia. 8(6):155–160. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.6.155>.
- Mansilla AY, Albertengo L, Rodríguez MS, Debbaudt A, Zúñiga A, Casalongué C. 2013. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Applied Microbiology and Biotechnology. 97(15):6957–6966. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4993-8>.
- Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. British Journal of Pharmacology. 150:552–558. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707130>.
- Megasari D, Damayanti TA, Santoso S. 2019. Penekanan penularan *Bean common mosaic virus* oleh efek penghambat makan kitosan terhadap *Aphis craccivora* Koch. Jurnal Hortikultura. 29(2):209–218. DOI: <https://doi.org/10.21082/jhort.v29n2.2019.p209-218>.
- Nagorskaya V, Reunov A, Lapshina L, Davydova V, Yermak I. 2014. Effect of chitosan on *Tobacco mosaic virus* (TMV) accumulation, hydrolase activity, and morphological abnormalities of the viral particles in leaves of *N. tabacum* L. cv. *Samsun*. Virologica Sinica. 29(4):250–256. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3452-8>.
- Napsah R, Wahyuningsih I. 2014. Preparasi nanopartikel kitosan-tpp/ekstrak etanol daging buah mahkota dewa (*Phaleriamacrocarpa* (scheff) *boerl*) dengan metode gelasi ionik. Journal of Pharmaceutical Science and Community. 11(1):7–12.
- Pandawani NP, Listihani L, Widnyana IK, Ariati PEP, Selangga DGW. 2022. High impact of *Clerodendrum paniculatum* leaf extract to suppress *Zucchini yellow mosaic virus* infection in zucchini plants. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 23(6):2914–2919. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230618>.
- Parikh BA, Tumer NE. 2004. Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. Mini-Reviews in Medical

- Chemistry. 4:523–543. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389557043403800>.
- Putri MM, Damayanti TA. 2020. Utilization of plant extracts to suppress *Squash mosaic virus* infection on ridged gourd (*Luffa acutangula* [L.] Roxb). *Journal of Tropical Pest and Diseases*. 20(2):108–115. DOI: <https://doi.org/10.23960/j.hptt.220108-115>.
- Rahmat S, Suwarno. 2020. Analisa spektroskopi inframerah transformasi fourier dan gas terlarut terhadap perubahan gugus fungsi komposisi minyak ester. *Jurnal Infotek mesin*. 11(1):14–23. DOI: <https://doi.org/10.35970/infotekmesin.v11i1>.
- Rajani, Mishra P, Kumari S, Saini P, Meena RK. 2022. Role of nanotechnology in Management of plant viral disease. *Materialstoday: Proceedings*. 69(1):1–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.06.355>.
- Rendina N, Nuzzaci M, Scopa A, Cuypers A, Sofo A. 2019. Chitosan-elicited defense responses in *Cucumber mosaic virus* (CMV)-infected tomato plants. *Journal of Plant Physiology*. 234–235:9–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.003>.
- Samudra AG, Ramadhani N, Lestari G, Nugroho BH. 2021. Formulasi nanopartikel kitosan ekstrak metanol alga laut coklat (*Sargassum hystrix*) dengan metode gelasi ionik. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 7(1):92–99.
- Verma HN, Baranwal VK, Srivastava S. 1998. Antiviral substances of plant origin. Di dalam: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H, editor. *Plant Viruses Diseases Control*. St. Paul (MN): APS Press. hlm 154–162.
- Vifta RL, Nurlaila D, Yanti S. 2022. Alginate-based nanoencapsulation on ultrasonic-assisted extraction of *Parijoto* fruit (*Medinilla speciosa* Blume) and its antioxidant activity. *Walisongo Journal of Chemistry*. 5(2):145–152. DOI: <https://doi.org/10.21580/wjc.v5i2.12509>.
- Wafi A, Atmaja L, Ni'mah YL. 2020. Analisis kuat tarik dan elongasi film gelatin-kitosan. *Alchemy: Journal of Chemistry*. 8(1):1–8. DOI: <https://doi.org/10.18860/al.v8i1.9097>.
- Warghane A, Saini R, Shri M, Andankar I, Ghosh DK, Chopade BA. 2024. Application of nanoparticles for management of plant viral pathogen: current status and future prospects. *Journal of Virology*. 592:109998. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.109998>
- Widyastama G, Kurniati M. 2021. Optimization of sonication time and surfactant concentration for chitosan-alginate coated ketoprofen nanoencapsulation. *Journal of Physics: Conference Series*. 1805:1–10. DOI: <https://doi.org/10.1088/17426596/1805/1/012003>.