

## **Biobakterisida Kitosan Cangkang Kerang Darah sebagai Anti Bakteri *Ralstonia solanacearum***

### **Biobactericide Chitosan Blood Shell as an Anti Bacterial *Ralstonia solanacearum***

**Nadila Nur Rahma Windari<sup>1,\*</sup>, Siti Isnaini Fauziah<sup>2</sup>, Anisya Eka Junior<sup>3</sup>, Tarzan Purnomo<sup>4</sup>**

State University of Surabaya, Ketintang, Surabaya, Indonesia

\*Corresponding author: nadilnur27@gmail.com

**Abstract:** Blood shell (*Anadara granosa*) are animal mollusks whose availability is abundant in nature and their shells are not utilized. Blood shell can be potentially in an environmentally friendly biological control effort, namely as a biobactericide to eradicate bacterial wilt in red chili (*Capsicum annum* L.). This study aims to examine the effect of giving biobactericides made from blood shell chitosan as an anti-bacterial agent on red chili plants. The method in this study was the experimental method using a completely randomized design (CRD). Red chili leaf samples that were affected by bacterial wilt were obtained from Tulungagung. Biobactericides made from blood shell chitosan shells are made through four stages, namely deproteinization, demineralization, depigmentation, and deacetylation. The test treatment used several concentrations of chitosan, which were 1%, 2%, 3%, and there were negative controls and positive controls with repetitions of four times. The anti-bacterial activity test data was analyzed by one-way ANOVA and continued with Duncan Test. The results showed that the administration of biobactericides made from blood shell chitosan had an effect on the growth of bacteria on wilting red chili plants. Treatment with a concentration of 2% resulted in the most optimum inhibition zone in inhibiting bacterial growth compared to other concentrations of 7.25 mm ± 1.50 mm. So, the blood shell chitosan has the potential as a biobactericide.

**Keywords:** *Blood shell, Chitosan, Biobactericides, Red Chili, and wilting bacteria*

## **1. PENDAHULUAN**

Cabai merah (*Capsicum annum* L.) merupakan tanaman rempah yang dibutuhkan oleh banyak orang hampir setiap hari untuk menambah cita rasa masakan maupun digunakan untuk kebutuhan pokok seperti memasak. Cabai merah termasuk salah satu komoditas sayuran unggulan yang sudah sejak lama diusahakan oleh petani secara intensif (Direktorat Jendral Hortikultura, 2009). Kebutuhan cabai setiap tahun mengalami peningkatan, namun produksinya yang sangat rendah jika dibandingkan dengan peningkatan kebutuhan yang mencapai 18% tiap tahun (Ratulangi, 2004).

Produksi cabai merah yang rendah pada pertanian disebabkan oleh gangguan hama penyakit. Hama penyakit yang menyerang, disebabkan oleh berbagai hal. Menurut Soetiarso dan Setiawati (2010), organisme pengganggu yang menyerang tanaman cabai merah adalah gangsir, trips, kutu kebul, kutu daun, layu bakteri, dan antrakos. Salah satu penyakit pada cabai yang sulit dikendalikan ialah penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum*. Hal tersebut dikarenakan bakteri yang menginfeksi tanaman cabai terus membelah setiap 20 menit sekali, sehingga infeksi terus berlangsung.

Gejala yang ditimbulkan karena penyakit layu bakteri yaitu daun terlihat layu dan diakhiri kematian

sel tanaman dalam waktu singkat. Pada mulanya, daun tampak layu pada salah satu daun pucuk dan diikuti oleh layunya daun bagian bawah. Setelah terlihat gejala lanjut dengan intensitas penyakit di atas 50%, tanaman akan mengalami kematian dalam waktu 7-25 hari. Pada gejala serangan lanjut terjadi pembusukan akar dan pangkal batang dengan terlihat adanya massa bakteri berwarna kuning keputihan seperti susu dan ini merupakan ciri khas dari serangan patogen penyakit layu bakteri (Nasrun dkk, 2017).

Serangan bakteri pada tanaman cabai merah sangat berbahaya karena dapat menyebabkan kematian tanaman dan kegagalan panen sehingga banyak menimbulkan kerugian atau penurunan hasil yang relatif besar. Untuk mengatasi penyakit layu bakteri pada cabai merah (*C. annum* L.) dibutuhkan formulasi anti bakteri.

Salah satu formulasi anti bakteri ialah berasal dari kitosan. Anti bakteri berbahan dasar kitosan adalah gugus fungsional amina, dan kitosan memiliki kemampuan menyerap dari kitosan yang mempunyai muatan positif. Sementara itu, sel membran mikroba bermuatan negatif. Muatan positif dan negatif ini akan berinteraksi secara elektrostatis yang menyebabkan membran mengalami tekanan permialabel dan menyebabkan tekanan osmotik di dalam sel tidak seimbang sehingga menghalangi pertumbuhan mikroba. Selain itu, di dalam sel juga

terjadi peristiwa hidrolisa dalam dinding sel yang menyebabkan keluarnya cairan elektrolit sel sehingga menyebabkan sel mati (Sarwono, 2010). Dengan kemampuan yang dimiliki oleh kitosan tersebut, maka kitosan dapat berpotensi sebagai anti bakteri pada cabai merah (*C. annum L.*).

Kitin dan kitosan merupakan bahan alam yang ketersediaannya sangat berlimpah. Kitin banyak terkandung pada cangkang hewan-hewan moluska salah satunya adalah kerang darah (*Anadara granosa*). Cara mendapatkannya dengan proses deproteinasi dan demineralisasi dengan asam basa kuat (Sarwono, 2010). Sementara itu, keberadaan limbah cangkang semakin mengganggu keseimbangan lingkungan, apabila limbah cangkang dibuang terus-menerus tanpa adanya pengolahan yang baik (Kusuma, 2012). Maka dari itu, perlu dilakukan penelitian ekstraksi kitosan untuk mengatasi bakteri pada tanaman cabai merah (*C. annum L.*) dengan menggunakan kitosan cangkang kerang darah (*A. granosa*) yang merupakan limbah dan melimpah di alam.

## 2. TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh pemberian biobakterisida berbahan kitosan cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) sebagai anti bakteri pada tanaman cabai merah (*Capsicum annum L.*). Selain itu, melalui penelitian ini diharapkan dapat ditentukan konsentrasi kitosan cangkang kerang darah yang paling optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri layu tanaman pada cabai merah.

## 3. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian inii adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan desain rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari tiga kelompok perlakuan dengan empat kali pengulangan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Gedung C9, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, selama lima bulan yaitu terhitung dari bulan Maret hingga Juli 2019.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah lumpang dan alu besar, ayakan 40 mesh, oven, gelas beaker (1000 mL dan 500 mL), gelas ukur (100 mL), labu erlenmeyer (2000 mL), hot plate, magnetic stirrer, timbangan analitik, pipet tetes, spatula, plastik, corong, blender, desikator, spektrofotometer FTIR, kamera, alat tulis, kertas saring, kertas pH indikator universal, water sampler, autoklaf, waterbath, inkubator, sentrifuge, vortex, oven, cawan petri, tabung reaksi, ose, dan skalpel. Sementara itu, bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*), tanaman cabai merah (*Capsicum annum L.*), NaOH 3,5%, HCl 2N, NaOCl 4%, NaOH 50%, akuades, asam asetat 2%, alkohol 70%, Akuades, media NA dan NB, Plastik PP, Aluminium foil, dan kapas.

Pengambilan sampel bakteri pada tanaman cabai merah (*C. annum L.*) dilakukan di daerah

Surabaya. Sampel yang diambil berupa bagian pucuk daun tanaman cabai merah yang layu (mengindikasikan adanya bakteri), sedangkan cangkang kerang darah (*A. granosa*) diperoleh dari Pantai Kenjeran, Surabaya. Setelah itu dilakukan ekstraksi kitosan cangkang kerang darah (*A. granosa*) dengan proses sebagai berikut:

### 2.1 Pembuatan serbuk cangkang kerang darah (*A. granosa*)

Pembuatan serbuk cangkang diawali dengan proses pencucian cangkang dengan air hingga bersih, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari. Cangkang yang sudah bersih ditumbuk dengan lumpang dan alu besar, kemudian diayak dengan menggunakan ayakan 40 mesh.

### 2.2 Deproteinasi

Serbuk cangkang hasil ayakan direaksikan dengan NaOH 3,5% dalam gelas beaker dengan perbandingan 1:10 (b/v), dipanaskan dengan suhu 90°C selama 1 jam menggunakan magnetic stirrer lalu didinginkan. Selanjutnya serbuk cangkang disaring menggunakan kertas saring dan dinetralkan dengan akuades, kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 4 jam.

### 2.3 Demineralisasi

Serbuk cangkang hasil deproteinasi direaksikan dengan HCl 2 N dalam gelas beaker dengan perbandingan 1:5 (b/v) menggunakan magnetic stirrer selama 60 menit pada suhu 90°C. Selanjutnya serbuk cangkang disaring menggunakan kertas saring dan dinetralkan dengan akuades. Hasil padatan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 4 jam.

### 2.4 Depigmentasi

Serbuk cangkang hasil demineralisasi direaksikan dengan NaOCl 4% dalam gelas beaker dengan perbandingan 1:10 (b/v) selama 60 menit pada suhu ruang. Serbuk cangkang kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dinetralkan dengan akuades. Hasil padatan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C selama 4 jam.

### 2.5 Deasetilasi

Serbuk cangkang hasil depigmentasi direaksikan dengan NaOH 50% dalam gelas beker dengan perbandingan 1:20 (b/v) selama 1 jam dengan suhu 100°C. Setelah suhu dingin, disaring dan dinetralkan dengan akuades. Hasil padatan dikeringkan dengan oven pada suhu 100°C selama 80 menit hingga menjadiserbuk.

Cara untuk mengidentifikasi gejala layu bakteri pada tanaman cabai merah (*C. annum L.*), yaitu mengambil bagian pucuk dari tanaman cabai merah



yang memiliki gejala terserang bakteri kemudian diamati dan diisolasi dengan cara daun dipotong-potong sebesar 5 mm dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi air steril. Kemudian sampel bakteri diisolasi dengan metode cawan tuang pada tingkat pengenceran  $10^{-7}$  sampai  $10^{-8}$  pada media Natrium agar (NA) Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $29^{\circ}\text{C}$ . Karakterisasi yang akan dilakukan meliputi pengamatan morfologi bakteri. Pengamatan morfologi dilakukan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia.

Pengaplikasian biobakterisida dilakukan dengan cara kitosan diujikan pada kultur bakteri yang telah diperoleh dari tanaman cabai merah (*C. annum L.*), kemudian diamati hasilnya dengan melihat zona bening yang terbentuk.

**Tabel 1.** Desain Eksperimen Aplikasi Biobakterisida Berbahan Kitosan pada Tanaman Cabai Merah (*C. annum L.*)

Kode	Perlakuan	Ulangan			
A	Asam Asetat 2% + Kitosan 0%	A1	A2	A3	A4
B	Asam Asetat 2% + Kitosan 1%	B1	B2	B3	B4
C	Asam Asetat 2% + Kitosan 2%	C1	C2	C3	C4
D	Asam Asetat 2% + Kitosan 3%	D1	D2	D3	D4
E	Asam Asetat 2% + Kloramfenikol	E1	E2	E3	E4

Tahap perlakuan yang dilakukan pada penelitian pembuatan biobakterisida ini yaitu masing-masing konsentrasi kitosan dilarutkan dalam asam asetat 2%, kemudian pengujian aktivitas anti bakteri dengan metode sumuran (difusi agar), lalu media agar (NA) dilubangi menggunakan alat pelubang gabus. Setelah itu, masing-masing perlakuan yang meliputi kontrol positif, masing-masing konsentrasi, dan kontrol negatif dimasukkan dalam sumuran. Kemudian, diinkubasi selama 48 jam, kemudian diamati zona hambat yang terbentuk.

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil sebagai berikut:

**Tabel 2.** Hasil Proses Ekstraksi Kitosan Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*)

Tahapan	Hasil (gram)
Deproteinasi	170,1
Demineralisasi	72,54
Depigmentasi	67,29
Deasetilasi	33,66

Proses ekstraksi kitosan berbahan cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) melalui empat tahap yaitu deproteinasi, demineralisasi, depigmentasi, dan deasetilasi. Berat awal serbuk cangkang kerang darah (*A. granosa*) yang diperoleh sebesar 175 gram. Berdasarkan hasil ekstraksi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa pada tahap deproteinasi

dihasilkan kitin sebesar 170,1 gram dengan keadaan yang belum kering sepenuhnya dan berwarna abu-abu. Tahap demineralisasi serbuk kitin sebesar 72,54 gram berwarna abu-abu. Sedangkan pada tahap depigmentasi dihasilkan serbuk berwarna putih kecoklatan sebesar 67,29 gram. Pada tahap terakhir yaitu tahap deasetilasi dihasilkan kitosan berwarna putih kecoklatan dengan berat 33,66 gram.

Proses deproteinasi dengan menggunakan NaOH 3,5% bertujuan untuk melepaskan ikatan-ikatan protein, sehingga protein yang terkandung di dalam cangkang akan larut dalam NaOH panas dan protein akan membentuk Na-proteinat yang akan larut (Kurniasih, dkk., 2007). Proses demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan kandungan mineral ( $\text{CaCO}_3$ ) atau garam anorganik dalam cangkang. Proses demineralisasi ditandai dengan adanya gelembung gas  $\text{CO}_2$  yang merupakan indikator terjadinya reaksi antara HCl dengan garam mineral yang ada di dalam cangkang (Kusumaningsih, 2004).

Proses depigmentasi yang menggunakan NaOCl bertujuan untuk merubah warna kitosan yang semula berwarna hitam kecoklatan menjadi putih kecoklatan (Arif, 2013). Pada penelitian yang telah dilakukan, tahap depigmentasi merubah warna serbuk cangkang kerang darah yang semula berwarna abu-abu menjadi putih, sedangkan proses deasetilasi merupakan persentase hilangnya gugus asetil dari kitin sehingga menghasilkan kitosan. Proses ini menggunakan NaOH 50% yang mampu memutus ikatan gugus karboksil dengan atom nitrogen pada kitin (Anjayani, 2009).

Selanjutnya merupakan tahap isolasi bakteri dari daun cabai merah (*Capsicum annum L.*) yang diperoleh dari Tulungagung. Tahap isolasi ini bertujuan untuk memindahkan bakteri yang berasal dari daun cabai merah (*C. annum L.*) ke media agar dengan kondisi terkontrol. Kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas biobakterisida berbahan kitosan cangkang kerang darah (*A. granosa*) sebagai antibakteri pada penyakit layu tanaman cabai merah (*C. annum L.*). Berdasarkan hasil uji aktivitas anti bakteri yang telah dilakukan, maka diperoleh diameter zona hambat yang disebabkan oleh adanya aktivitas anti bakteri diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil dianalisis dengan menggunakan uji analisis varian ANAVA satu arah menunjukkan bahwa hasil analisis memiliki nilai signifikansi 0,05 sehingga data zona hambat akibat aktivitas penghambatan setiap konsentrasi kitosan terhadap bakteri layu tanaman pada cabai merah signifikan dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan cangkang kerang darah yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri layu tanaman yaitu konsentrasi 2% (**Tabel 4.2**). Berikut merupakan hasil uji statistik ANAVA satu arah kitosan cangkang kerang darah terhadap bakteri layu tanaman pada cabai merah.

**Tabel 3.** Hasil Uji Statistik ANAVA Satu Arah Kitosan Cangkang Kerang Darah Terhadap Bakteri Layu Tanaman Pada Cabai Merah.

No.	Perlakuan	Rata-Rata
1.	Kontrol Negatif (asam asetat 2%)	10,08±3,73 <sup>ab</sup>
2.	Kontrol Positif (Kloramfenikol)	11,00±4,55 <sup>b</sup>
3.	Kitosan Konsentrasi 1% + asam asetat 2%	5,75±1,50 <sup>a</sup>
4.	Kitosan Konsentrasi 2% + asam asetat 2%	<b>7,25±1,50<sup>ab</sup></b>
5.	Kitosan Konsentrasi 3% + asam asetat 2%	6,75±3,86 <sup>ab</sup>

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri kitosan cangkang kerang darah dengan menggunakan metode difusi agar (sumuran) diperoleh hasil berupa adanya zona hambat yang terbentuk dari perlakuan yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan cangkang kerang darah mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kitosan dengan konsentrasi 2% lebih optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri layu tanaman pada cabai merah dibandingkan dengan konsentrasi yang lain. Diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 7,25±1,50 mm. Hal tersebut dikarenakan kekentalan larutan kitosan 2% masih rendah sehingga masih dapat berdifusi ke media agar tempat tumbuhnya bakteri. Zona hambat menurun saat dilakukan peningkatan konsentrasi kitosan sebanyak 3% yaitu sebesar 6,75±3,86 mm. Hal ini disebabkan karena larutan kitosan 3% memiliki konsistensi yang sudah terlalu kental sehingga tidak bisa berdifusi dengan baik dalam media agar.

Pada pengujian dengan menggunakan metode sumuran diharapkan mampu berdifusi ke media tumbuh bakteri. Konsentrasi kitosan yang tinggi akan menghasilkan larutan yang kental dan sulit untuk melakukan difusi jika dibandingkan dengan larutan yang lebih encer. Ukuran molekul kitosan yang besar jika dilihat dari bentuk fisik sehingga larutan kitosan menjadi kental mendekati gel yang akan mengakibatkan larutan memiliki kemampuan berdifusi yang kurang baik. Molekul kitosan yang cukup besar juga tidak dapat menembus dinding sel bakteri. Akibatnya, kitosan dengan konsentrasi 3% menunjukkan penurunan diameter zona hambat.

Kontrol negatif menghasilkan zona hambat sebesar 10,08±3,73 mm, hal ini dikarenakan pada kontrol negatif menggunakan pelarut berupa asam asetat 2%. Efek penghambatan tersebut bukan merupakan aktivitas dari kitosan, karena asam asetat juga mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri (Nurainy dkk, 2008). Berdasarkan serangkaian uji yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa kitosan cangkang kerang dapat mengatasi penyakit layu bakteri, sehingga berpotensi dijadikan sebagai biobakterisida.

## 5. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh signifikan pemberian biobakterisida berbahan kitosan cangkang

kerang darah terhadap bakteri penyakit layu tanaman cabai merah. Konsentrasi kitosan 2% merupakan konsentrasi yang paling optimum untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang dapat dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat sebesar 7,25±1,50 mm. Sehingga, kitosan cangkang kerang darah berpotensi sebagai biobakterisida.

## 6. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Belmawa Dikti atas pendanaan kegiatan penelitian melalui Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian Eksakta.

## 7. DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, Ilham. (2017) .*Pemanfaatan Limbah Cangkang Kerang Darah (Anadara granosa) sebagai bahan Abrasif Dakam Pasta Gigi*. Makassar: *Jurnal Galung Tropika*. ISSN Online 2407-6279. (Online). <http://jurnalpertanianumpar.com/index.php/jgtarticlview/210163.pdf>. Diakses Tanggal 1 Oktober 2018.
- Badan Pusat Statistik, (2011) . Produksi Cabai Meningkat, Bawang Merah Turun. <http://jaringnews.com/ekonomi/sector-riil/19896/bps-produksi-cabai-meningkat-bawang-merah-turun.html>.
- Djereng, D.K., Kawuri, R., dan Ramona, Y. ( 2017) . Potensi *Bacillus sp. B3* Sebagai Agen Biokontrol Penyakit Layu Bakteri Yang Disebabkan Oleh *Ralstonia Sp.* Pada Tanaman Cabai (*Capsicum annum L.*). Bali: *Jurnal metamorfosa IV* (2): 237-246. ISSN2302-5697.
- Direktorat Jendral Hortikultura. ( 2009 ). *Gambaran Kinerja Makro Hortikultura 2008*. Jakarta: Direktorat Jendral Hortikultura.
- Ditjen Pengolahan Pemasaran Hasil Perikanan. (2008) . Scallop di Indonesia Belum Ngetop : Warta Pasar Ikan. Edisi Juli 2008 No. 59 (hal : 6-7). Direktorat Pemasaran Dalam Negeri. Departemen Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- Duriat, A.S. (2009) .*Pengendalian Penyakit Kuning Keriting Pada Tanaman Cabai Kecil*. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Bandung. (5): 43-45.
- Fegan, M. and Prior, P. (2005) . How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex” in: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. Pages 449-461
- Firmansyah, I. (2005). *Gambaran Histopatologik Tulang Femur Tikus Putih (Rattus norvegicus) Pasca Ovariohisterektomi dengan Suplemen Kalsium Karbonat Dosis Tinggi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Kusuma, E. W. (2012). *Pemanfaatan Limbah Kulit Kerang sebagai Bahan Campuran Pembuatan Paving Block*. Program Studi Teknik



- Lingkungan. Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan. Surabaya: Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jawa Timur.
- Mekawati, Fachriyah, E. dan Sumardjo, D., (2000) .  
“Aplikasi Kitosan Hasil tranformasi Kitin Limbah Udang (*Penaeus merguensis*) untuk Adsorpsi Ion Logam Timbal”. *Jurnal Sains and Matematika*. FMIPA Undip. Semarang. Vol. 8 (2). hal. 51-54.
- Muzzarelli, R.A.A., (1985) .“*Chitin*”. New York: Pergamon Press.
- Muzzarelli, R.A.A., (1985) .“*Chitin*”. New York: Pergamon Press.
- Nasrun. (2007) .Karakteristik Fisiologis *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Nilam. *Jurnal Litri*. 13(2) :43-48.
- Nasrun, Christanti, Arwiyanto, T., dan Mariska, I. (2007). Karakteristik Fisiologis *Ralstonia solanaceum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Nilam. Yogyakarta: *Jurnal Litri* VOL 13 NO 2 ISSN0853-8212.
- Purwanngsih, S. (2003) . *Isolasi, Populasi dan Karakterisasi Bakteri Pelarut Fosfat pada Tanah pada Tanaman Bogani Nani Wartabone*. Sulawesi Utara: Biologi, 3 (1):22-31.
- Ratulangi, M. M. (2004) . “Control of Sclerotium Wilt Diseases on Soybean by Soil Solarization Eugenia”. *Publication of the Australian Centre for International Agricultural Research*. 10(1): 1-7.
- Sarwono R, (2010) .*Pemanfaatan Kitin / Kitosan Sebagai Bahan Antimikroba*, Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.