

EFEKTIVITAS KITOSAN MIKROKRISTALIN SEBAGAI ALTERNATIF ANTIBAKTERI ALAMI DALAM MOUTHWASH

The Effectiveness of Microcrystalline Chitosan as a Natural Antibacterial Agent in Mouthwash

Bustami Ibrahim*, Pipih Suptijah, Ahmad Zahid

Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor

Diterima 7 Mei 2010/Disetujui 16 Juli 2012

Abstract

Microcrystalline chitosan is a chitosan that has been modified by minimizing its particle size. Chitosan possesses antibacterial property. The use of microcrystalline chitosan as an antibacterial in the mouthwash has not been revealed yet. This study was done to compare the degree effectiveness of mouthwash that contain microcrystalline chitosan as an antibacterial and commercial mouthwash. The parameters measured in this study were proximate analysis, yield, deacetylation (Fourier Transform Infrared), particle size (Scanning Electron Microscopy), and total plate count. Microcrystalline chitosan contained moisture, ash, nitrogen and yield were 3.92% dry weight basis (db); 4% db, 1.4% db; and 50% respectively. Detection results of FTIR and SEM showed the size of microcrystalline chitosan was 0.6-6 μ m and degree of deacetylation was 88.66%. Mouthwash that contained 0.5%, 1% and 1.5% microcrystalline chitosan could reduce TPC bacteria up to 97.57%, 99.05% and 99.46% respectively, while commercial mouthwash reduced TPC bacteria up to 89.70%.

Keywords: antibacterial, microcrystalline chitosan, mouthwash.

Abstrak

Kitosan mikrokristalin merupakan hasil modifikasi kitosan dengan cara memperkecil ukuran partikelnya. Kitosan ini dapat berfungsi sebagai antibakteri. Penggunaan kitosan mikrokristalin sebagai antibakteri dalam *mouthwash* belum pernah dilakukan, oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menentukan efektivitas antibakteri terbaik kitosan mikrokristalin dalam *mouthwash* serta membandingkan kemampuan antibakteri *mouthwash* berbahan kitosan mikrokristalin dengan *mouthwash* komersial. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah analisis proksimat, rendemen, derajat deasetilasi (FTIR), ukuran partikel (SEM), dan TPC. Hasil pengukuran rendemen dan analisis proksimat kitosan mikrokristalin yang meliputi kadar air, abu dan nitrogen masing-masing memiliki nilai berturut-turut 50%; 3,92% bk; 4% bk; dan 1,4% bk. Hasil deteksi FTIR dan SEM menunjukkan bahwa kitosan mikrokristalin memiliki ukuran 0,6-6 μ m dan derajat deasetilasi sebesar 88,66%. *Mouthwash* dengan kandungan kitosan mikrokristalin 0,5%; 1%; dan 1,5% masing-masing dapat menurunkan jumlah TPC bakteri sebesar 97,57%; 99,05% dan 99,46%, sedangkan *mouthwash* komersial hanya dapat menurunkan jumlah TPC bakteri sebesar 89,70%.

Kata kunci: antibakteri, kitosan mikrokristalin, *mouthwash*.

PENDAHULUAN

Hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) yang dilakukan Departemen Kesehatan RI menyebutkan bahwa penyakit

mulut dan gigi menduduki urutan pertama dengan jumlah 60 persen dari 10 penyakit terbanyak yang diderita masyarakat. Angka permasalahan yang tinggi tersebut tidak dapat dianggap remeh. Menjaga kesehatan mulut dan gigi berarti juga menjaga seluruh kesehatan tubuh, karena gigi yang tidak sehat

*Korespondensi: Jln. Lingkar Akademik, Kampus IPB Dramaga. Telp. +622518622915 Fax. +622518622916 e-mail: bustamibr@yahoo.com

atau pada umumnya berlubang sangat mudah terjangkit kuman dan bakteri yang kemudian apabila menembus ke pembuluh darah dapat menggumpal di jantung (Loesche *et al.* 1998; Malik 2008; Pedersen *et al.* 2005).

Permasalahan cukup serius yang timbul akibat dari penyakit mulut dan gigi perlu diimbangi pula dengan kesadaran yang tinggi dari masyarakat dalam menjaga kesehatan dan kebersihan mulut dan gigi. Salah satu aktivitas dalam menjaga kesehatan serta kebersihan mulut dan gigi yang sering dilakukan masyarakat adalah dengan cara menyikat gigi atau cara pembersihan mekanis. Menyikat gigi ternyata kurang efektif dalam membersihkan kondisi gigi, karena menyikat gigi tidak dapat dilakukan secara sempurna pada tiap individu karena adanya beberapa faktor misalnya letak gigi yang berjejal.

Salah satu cara pemeliharaan kebersihan gigi dan mulut yang efektif ialah dengan cara berkumur menggunakan obat kumur (*mouthwash*). Penggunaan obat kumur sangat efektif karena kemampuannya menjangkau tempat yang sulit dibersihkan dengan sikat gigi dan dapat merusak pembentukan plak. Penggunaan antiseptik dalam obat kumur dewasa ini diduga dapat berefek karsinogenik terhadap penggunaannya. Fakta tersebut didukung dari hasil penelitian McCullough dan Farah (2008) yang menyatakan bahwa pemakaian *mouthwash* dengan kandungan antiseptik berupa alkohol dapat memicu terjadinya kanker mulut. Melihat dari permasalahan tersebut salah satu terobosan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah menggunakan kitosan mikrokristalin sebagai antiseptik dan antibakteri yang alami serta aman bagi penggunaannya. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah menentukan efektivitas antibakteri terbaik kitosan mikrokristalin dalam *mouthwash* serta membandingkan dengan *mouthwash* komersial.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan mikrokristalin.

Bahan yang digunakan untuk produksi kitosan mikrokristalin adalah kitosan komersial larut asam, CH_3COOH , NaOH dan akuades. Bahan-bahan untuk analisis proksimat antara lain akuades, kjeltab jenis selenium, larutan H_2SO_4 pekat, NaOH , H_3BO_3 , HCl 0,1 N, HgO , H_2O_2 dan AgNO_3 , akuades, K_2SO_4 , HgO , H_2SO_4 . Bahan-bahan untuk analisis derajat deasetilasi adalah $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ p.a. Bahan-bahan untuk analisis ukuran partikel dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) adalah aseton, pasta perak (*Dotite*), *fine coat*, nitrogen cair. Bahan yang digunakan untuk uji total plate count (TPC) antara lain garam fisiologis dan media NA.

Alat-alat yang digunakan untuk produksi kitosan mikrokristalin antara lain *magnetic stirrer*, kompor listrik, gelas ukur, gelas piala, dan *spray dry*. Alat-alat yang digunakan untuk analisis proksimat meliputi timbangan digital, pisau, sudip, cawan porselen, aluminium foil, gegep, desikator, oven, kompor listrik, tanur pengabuan, labu Kjeldahl, destilator, labu Erlenmeyer, buret dan pipet volumetrik. Alat yang digunakan untuk analisis derajat deasetilasi adalah Fourier Transform Infrared (SHIMADZU, FTIR-8400). Alat yang digunakan untuk menentukan ukuran partikel SEM-EDX 5310LV (JEOL). Alat-alat yang digunakan untuk analisis TPC diantaranya cawan petri, vortex, sudip, inkubator, dan *colony counter*.

Metode Penelitian

Penelitian diawali dengan penelitian pendahuluan berupa analisis mutu kitosan komersil meliputi analisis kadar air, mineral, protein, dan derajat deasetilasi. Penelitian utama terdiri atas (1) produksi dan karakterisasi kitosan mikrokristalin; (2) produksi *mouthwash* dan pengujian efektivitas antibakteri *mouthwash* kitosan mikrokristalin terhadap bakteri gigi dan mulut.

Produksi kitosan mikrokristalin diawali dengan pelarutan kitosan komersil dengan larutan CH_3COOH 2%. Larutan kitosan tersebut selanjutnya dihomogenisasi agar

Tabel 1 Hasil analisis proksimat kitosan

Spesifikasi	Hasil Uji	Protan Laboratories (1987)	Ibrahim <i>et al.</i> (2009)
Penampakan	Serpihan	Serpihan	
Kadar air	4,00%	≤ 10%	8,98%
Kadar abu	0,21%	≤2%	1,04%
Kadar N	1,33%	<5%	4,87%
Derajat deasetilasi	80,00%	70%	82,0%

memperoleh ukuran partikel yang jauh lebih kecil menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 5000-10.000 rpm selama 1 jam. Tahap selanjutnya berupa penambahan secara perlahan NaOH 10% hingga terjadi proses presipitasi atau pengendapan partikel terlarut. Partikel terlarut yang telah mengendap, selanjutnya dicuci hingga mencapai kondisi pH partikel netral. Tahap terakhir proses produksi kitosan mikrokristalin berupa proses pengeringan partikel kitosan mikro menggunakan *spray dryer* sehingga memperoleh bubuk kitosan mikrokristalin. Kitosan mikrokristalin yang telah diproduksi kemudian dianalisis mutunya berupa analisis kadar air, kadar mineral, dan kadar nitrogen (AOAC 2005), selanjutnya dihitung nilai derajat deasetilasi (DD) (Domszy dan Robert 1985) menggunakan alat FTIR. Penentuan ukuran partikel dilakukan menggunakan SEM (Lin *et al.* 2002).

Tahap produksi *mouthwash* dengan zat antibakteri kitosan mikrokristalin diawali dengan proses pelarutan kitosan mikrokristalin dengan konsentrasi masing-masing sebesar 0,5%, 1%, dan 1,5%. Larutan *mouthwash* kitosan mikrokristalin kemudian ditambahkan zat rasa seperti sodium sakarin dan *mint* ke dalam masing-masing larutan kitosan mikrokristalin tersebut. *Mouthwash* yang dihasilkan diuji efektivitas antibakteri dengan dikumurkan oleh dua orang probandus yang memiliki karakter gigi berlubang dan tidak berlubang. Pengambilan sampel dilakukan pada selang waktu sebelum berkumur, dan setelah berkumur pada jam ke-0, jam ke-4 dan jam ke-8. Pengamatan efektivitas antibakteri dilakukan dengan perhitungan

TPC. Percobaan ini dilakukan sebanyak dua kali ulangan. Data hasil perhitungan TPC kemudian diuji secara statistik. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan rancangan acak kelompok *intime* dengan uji lanjut Duncan ($p < 0,05$) (Steel dan Torrie 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Pendahuluan

Hasil analisis proksimat yang meliputi kadar air, abu dan nitrogen kitosan komersial memiliki nilai berturut-turut 4% bk; 0,21% bk; dan 1,33% bk. Kitosan tersebut memiliki derajat deasetilasi sebesar 80% (Tabel 1).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa kitosan komersial memiliki kadar air sebesar 4% bk. Kadar air kitosan tersebut telah memenuhi standar mutu yang ditetapkan Protan Laboratories (1987) maksimal sebesar 10% bk. Kadar air kitosan dipengaruhi oleh lama penyimpanan bahan baku dan lingkungan. Lingkungan yang lembab memberikan pengaruh besar terhadap kadar air dalam kitosan. Kumar (2000) menyatakan bahwa kitosan memiliki sifat yang mudah menyerap air (hidrofilik), sehingga apabila kitosan disimpan terlalu lama dan berada pada kondisi lingkungan yang lembab maka kadar air kitosan semakin meningkat.

Kadar abu dalam kitosan larut asam sebesar 0,21% bk. Nilai tersebut telah memenuhi standar mutu Protan Laboratories (1987) yang menstandarkan kadar mineral kitosan kurang dari 2%. Kadar mineral kitosan dipengaruhi oleh kualitas air yang digunakan ketika proses penetralan serta efektivitas proses demineralisasi yang dilakukan.

Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa kitosan larut asam memiliki kadar nitrogen dan derajat deasetilasi masing-masing sebesar 1,33% bk dan 80%. Kadar nitrogen dan derajat deasetilasi ini sesuai dengan standar mutu yang telah ditetapkan Protan Laboratories.

Penelitian Utama

Karakterisasi kitosan mikrokristalin

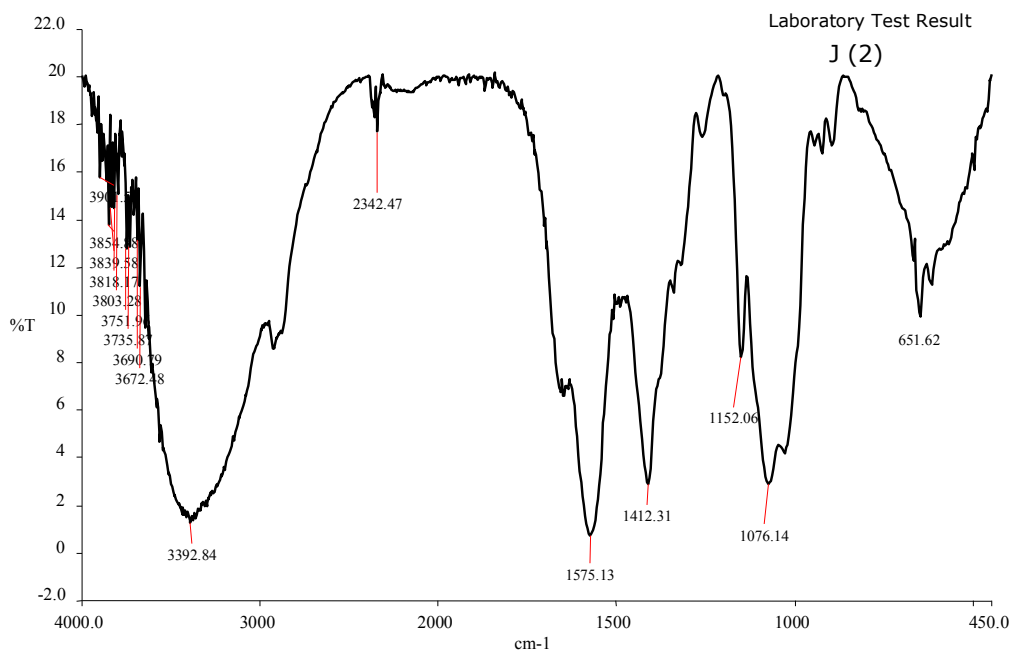
Kitosan komersial yang telah dianalisis mutunya kemudian dimodifikasi menjadi kitosan mikrokristalin dengan memperkecil ukuran partikelnya. Mutu kitosan mikrokristalin yang telah dihasilkan ditentukan dengan pengukuran rendemen, analisis proksimat, analisis FTIR, analisis SEM, dan uji TPC rongga mulut dan gigi.

Hasil pengukuran rendemen dan analisis proksimat kitosan mikrokristalin yang meliputi kadar air, abu, dan nitrogen masing-masing memiliki nilai berturut-turut 50%; 3,92% bk; 4% bk; dan 1,4% bk. Suptijah *et al.* (1992) menyatakan bahwa standar kadar air kitosan kurang dari 10% bk, nitrogen kurang dari 5% bk dan abu kurang dari 2% bk.

Spektrum inframerah digunakan untuk menentukan derajat deasetilasi kitosan mikrokristalin, gugus fungsi kitosan yang terdiri atas gugus OH, CH, NH, amida dan karbonil pada bilangan gelombang 3414 cm^{-1} , 2480 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 1384 cm^{-1} dan 1075 cm^{-1} (Tabel 3). Derajat deasetilasi (DD) kitosan mikrokristalin yang dihasilkan sebesar 88,66% (Gambar 1). Nilai DD di

Tabel 3 Karakteristik gugus fungsi dari kitosan

Standar Bilangan gelombang (cm^{-1})	Gugus Fungsional	Hasil Penelitian Bilangan Gelombang (cm^{-1})
3450	OH	3392
2400	CH	2342
1650	NH	1575
1550	amida	1412
1070	C=O	1076



Gambar 1 Spektrum FTIR kitosan mikrokristalin.

atas 70% menandakan bahwa modifikasi kitosan menjadi kitosan mikrokristalin tidak mengubah sifat fungsional kitosan tersebut. Muzarelli dan Peter (1997) menyatakan bahwa kitin dengan derajat deasetilasi lebih dari 70% dapat dikatakan sebagai kitosan. Hasil pendeteksian FTIR menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh tidak berbeda signifikan terhadap gugus fungsinya, hal ini menunjukkan bahwa proses modifikasi sudah dapat menghasilkan kitosan dengan gugus fungsi yang cukup identik dengan standar.

Nilai karakteristik fisik berupa ukuran partikel diukur menggunakan SEM. Ukuran partikel dapat ditentukan dengan mengukur diameter partikel tersebut. Perbesaran yang digunakan yaitu mulai dari 1000 hingga 20.000 kali. Hasil pengukuran diameter menggunakan foto SEM didapatkan ukuran partikel kitosan mikrokristalin berkisar 0,6-6 μm (Gambar 2). Proses modifikasi kitosan menjadi kitosan mikrokristalin dengan teknik presipitasi telah berhasil mendapatkan ukuran partikel mikro bahkan mencapai ukuran nano. Mohanraj dan Chen (2006) menyatakan bahwa partikel yang berbentuk padat dengan ukuran sekitar 10-1000 nm dapat dikatakan sebagai nano partikel. Nano partikel dari bahan polimer *biodegradable* dan *biocompatible* merupakan perkembangan yang baik karena diduga mampu terserap secara utuh di dalam sistem pencernaan setelah masuk ke dalam

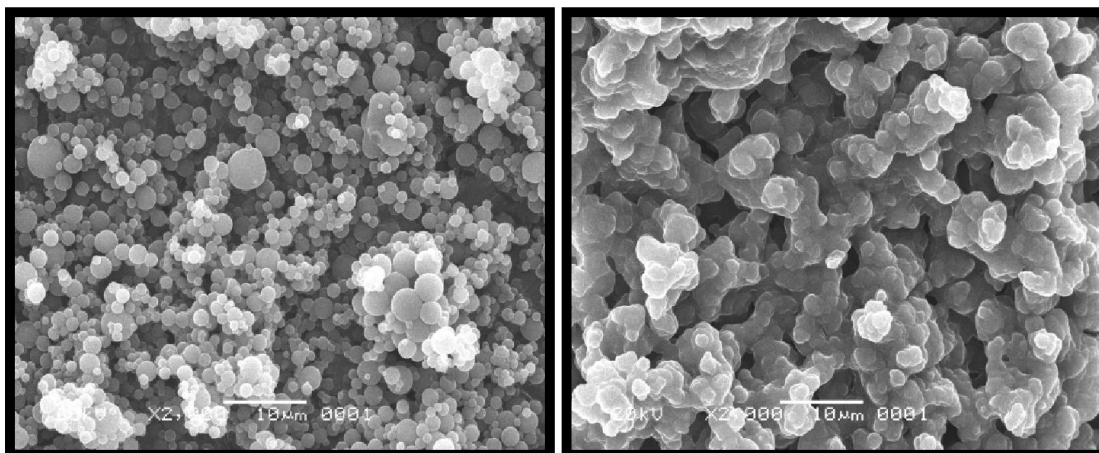
tubuh (Wu *et al.* 2005).

Pengujian Efektivitas *Mouthwash* Kitosan Mikrokristalin

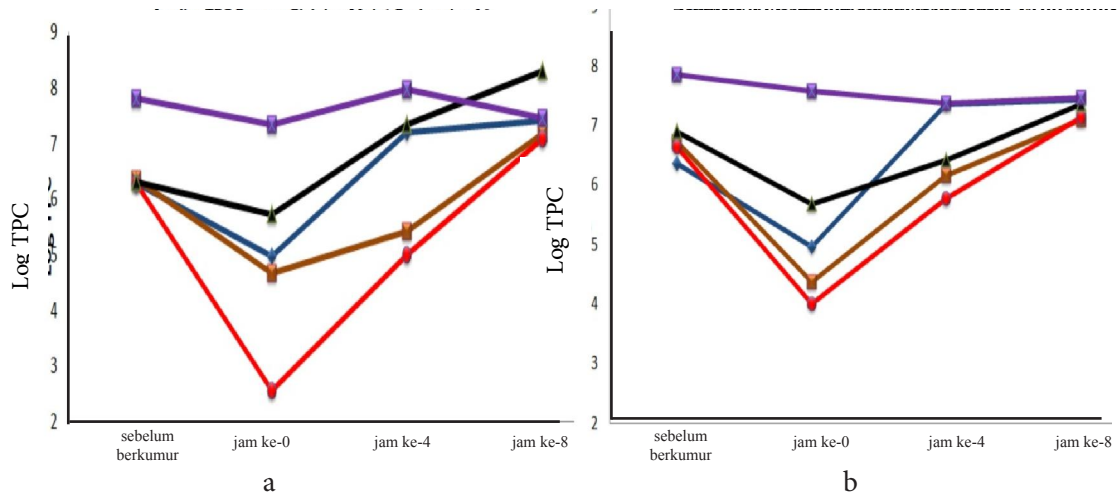
Mouthwash kitosan mikrokristalin berbagai konsentrasi diaplikasikan secara *in vivo* dengan cara berkumur pada dua orang probandus usia 21 tahun dengan karakterisasi gigi berlubang dan tidak berlubang.

Hasil analisis ragam terhadap kandungan nilai TPC berdasarkan karakter jenis gigi probandus 1 (tidak berlubang) dan probandus 2 (gigi berlubang) (Gambar 3) menunjukkan bahwa perbedaan jenis gigi tidak memberikan pengaruh nyata dengan selang kepercayaan 95% terhadap nilai TPC pada setiap taraf waktu pengambilan sampel dan konsentrasi kitosan mikrokristalin. Perbedaan jenis gigi tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai TPC kedua probandus dapat disebabkan faktor *oral hygiene* yang diterapkan pada probandus 2 (gigi berlubang) masih tergolong baik. Pintauli dan Hamada (2008) menyatakan bahwa peningkatan bakteri pada individu dengan *oral hygiene* buruk dapat meningkatkan bakteri pada permukaan gigi sebanyak 2-10 kali lipat.

Pada setiap taraf konsentrasi *mouthwash* kitosan mikrokristalin dengan selang waktu pengambilan sampel sebelum berkumur, dan setelah berkumur pada jam ke-0, jam ke-4, dan jam ke-8 (Gambar 4) menunjukkan



Gambar 2 Hasil SEM dari kitosan mikrokristalin.



Gambar 3 Nilai TPC probandus 1 (gigi tidak berlubang) [a] dan probandus 2 (gigi berlubang) [b] pada setiap waktu pengambilan sampel dan konsentrasi penggunaan *mouthwash* kitosan mikrokristalin (♦ *mouthwash* kitosan mikrokristalin 0,5%, ■ *mouthwash* kitosan mikrokristalin 1%, ● *mouthwash* kitosan mikrokristalin 1,5%, Δ kontrol positif, × kontrol negatif).

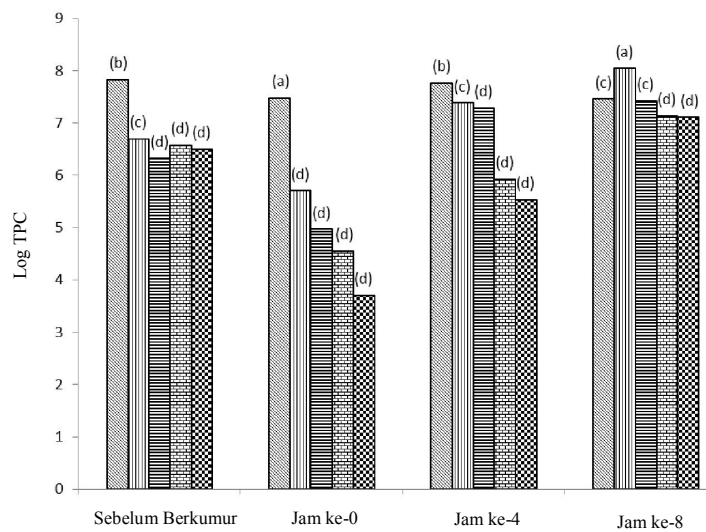
bahwa interaksi antara konsentrasi dan waktu pengambilan sampel memberikan pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai TPC rongga gigi dan mulut yang dihasilkan. Uji lanjut Duncan menunjukkan hambatan bakteri yang terjadi dari sebelum berkumur hingga setelah berkumur (jam ke-0) membuktikan bahwa perbedaan konsentrasi kitosan mikrokristalin dalam *mouthwash* memberikan pengaruh yang nyata. Hambatan bakteri terbaik hingga jam ke-0 dihasilkan dari hasil berkumur dengan *mouthwash* kitosan mikrokristalin 0,5, 1, dan 1,5% yang mampu mengurangi jumlah bakteri secara berturut-turut sebesar 97,57, 99,05, dan 99,46%, sedangkan *mouthwash* komersial (kontrol positif) hanya mampu menurunkan bakteri sebesar 89,70%.

Uji lanjut Duncan untuk hambatan bakteri dari jam ke-0 hingga jam ke-4 menunjukkan bahwa *mouthwash* dengan konsentrasi kitosan mikrokristalin 0,5, 1, dan 1,5% memiliki pengaruh nyata dibandingkan dengan kontrol positif (*mouthwash* pembanding) dan kontrol negatif. Uji lanjut Duncan menunjukkan hambatan terbaik dihasilkan dari hasil berkumur dengan *mouthwash* kitosan mikrokristalin konsentrasi 1,5% sebesar

83,72% atau mampu menghambat bakteri dari $4,93 \times 10^6$ hingga $3,41 \times 10^5$ koloni bakteri. *Mouthwash* dengan konsentrasi kitosan mikrokristalin 1% hanya mampu menghambat bakteri sebesar 77,86% dan untuk konsentrasi 0,5% nilai hambatan bakteri yang dihasilkan pada jam ke-4 sudah melebihi jumlah bakteri saat sebelum berkumur, akan tetapi masih jauh lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif.

Hasil yang didapatkan dari semua perlakuan *mouthwash* jam ke-8 telah melebihi jumlah bakteri pada saat awal atau sebelum berkumur. Uji lanjut Duncan menunjukkan *mouthwash* kitosan mikrokristalin konsentrasi 1 dan 1,5% memiliki hambatan yang berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan *mouthwash* lainnya. Perbedaan daya hambat bakteri yang terjadi pada setiap taraf konsentrasi *mouthwash* kitosan mikrokristalin mendukung dari pernyataan Liu (2003) yang menjelaskan bahwa aktivitas antibakteri tergantung pada konsentrasi kitosan dalam larutan. Aktivitas antibakteri dari kitosan dalam medium akan meningkat jika konsentrasi kitosan meningkat.

Mekanisme aktivitas antibakteri kitosan terjadi melalui interaksi gugus NH_3 glukosamin dengan permukaan sel yang



Gambar 4 Nilai rata-rata TPC pada setiap taraf interaksi konsentrasi dan waktu pengambilan sampel (▨ kontrol negatif, ▩ kontrol positif, ▬ 0,5%, ▤ 1%, ▥ 1,5%).

bermuatan negatif (Eldin *et al.* 2008). Adanya daya tarik secara struktural antara dinding sel bakteri dan kitosan disebabkan dinding sel bakteri mengandung peptidoglikan yang struktur dasar rantai utamanya terdiri atas N-asetilglukosamin dan β -glikan (Qujeq dan Mossavi 2004). Rafaat *et al.* (2008) menyatakan bahwa interaksi awal antara polikationik kitosan dan polimer dinding sel yang bermuatan negatif dipengaruhi oleh interaksi elektrostatis dan asam teikoat, akibatnya, pengikatan kitosan pada polimer dinding sel memicu terjadinya efek seluler kedua, yaitu destabilisasi dan perusakan fungsi membran bakteri sehingga mengganggu fungsi membran sebagai pelindung. Permeabilitas membran terganggu dan mengakibatkan pergerakan substansi bakteri terhambat.

KESIMPULAN

Hasil modifikasi kitosan menjadi kitosan mikrokristalin dengan metode presipitasi menghasilkan kitosan dengan ukuran partikel berkisar dari 0,6-6 μ m. Karakteristik mutu kitosan mikrokristalin yang dihasilkan tidak memiliki perbedaan yang cukup signifikan dengan standar yang ditetapkan Protan Laboratories (1987). *Mouthwash* kitosan

mikrokristalin memiliki nilai efektivitas penurunan nilai TPC lebih baik dibandingkan dari hasil berkumur dengan *mouthwash* komersial.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical of Chemist. Arlington: The Association of Official Analytical Chemist, Inc.
- Ibrahim B, Suptijah P, Prantommy. 2009. Pemanfaatan kitosan pada pengolahan limbah cair industri perikanan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 12(2): 154-166.
- Domszy JG, Robert GAF. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Journal Macromoleculer Chemistry and Physics* 186(8): 1671-1677.
- Eldin MSM, Soliman EA, AI Hashem, Tamer TM. 2008. Antibacterial activity of chitosan chemically modified with new technique. *Journal Trends Biomaterial Artificial Organs* 22(3): 121-133.
- Kumar MNR. 2000. A review of chitin and

- chitosan application. *Journal Reactive and Functional Polymers* 46: 1-27.
- Lin S, Huff HF, Hsieh F. 2002. Extraction process parameter, sensory characteristics and structural properties of a high moisture soy protein meat analog. *Journal of Food Science and Technology* 67(3): 1066-1072.
- Liu J. 2003. Preparation and Characteritition of chitosan Cu II affinity membrane for area adsorption. *Journal of Applied Polymer Science* 90(4): 1508-1112.
- Loesche WJ, Schork A, Terpenning MS, Chen Y, Dominguez BL, Grossman N. 1998. Assessing the relationship between dental disease and coronary heart disease in elderly U.S. veterans. *Journal of The American Dental Association* 129(3):301-311.
- Malik. 2008. Sakit-Gigi Bisa Picu Penyakit Kronis. <http://www.dechacare.com/Sakit-Gigi-Bisa-Picu-Penyakit-Kronis-I231.html> [30 September 2010].
- McCullough MJ, Farah CS. 2008. The role of alcohol in oral carsinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Australian Dental Journal* 53(4): 302-305.
- Mohanraj UJ, Chen Y. 2006. Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1): 561-573.
- Muzzarelli RAA, Peter MG. 1997. *Chitosan Handbook*. European Chitin Society.
- Pedersen PH, Avlund K, Douglas E. Morse, Stoltze K, Katz RV, Viitanen M, Winblad B. 2005. Dental caries, periodontal disease, and cardiac arrhythmias in community-dwelling older persons aged 80 and older: Is there a link?. *Journal of the American Geriatrics Society* 53(3): 430-437.
- Pintauli S, Hamada T. 2008. *Menuju Gigi dan Mulut Sehat, Pencegahan dan Pemeliharaan Karies Gigi*. Medan: USU Press.
- Protan Laboratories. 1987. *Cation Polymer for Recovery Valuable by Products from Processing Waste*. Protan Laboratories Inc. 1725 Ocean Avenue, Raymond, Washington USA.
- Qujeq D, Mossavi SE. 2004. Antibacterial activity of chitosan against *Escherichia coli*. *Journal Babol Medical Science* 7: 1-12.
- Rafaat D, Kristine Von K, Albert H, Hans George S. 2008. Insight into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology* 74(5): 3764-3773.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. Terjemahan: Bambang Sumantri, Jakarta: PT. Gramedia Utama.
- Suptijah P, Salamah E, Sumaryanto H, Purwaningsih S, Santoso J. 1992. Pengaruh Berbagai Isolasi Khitin Kulit Udang Terhadap Mutunya. Laporan Penelitian. Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan IPB. Bogor.
- Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. 2005. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics* 295: 235-245.