

Chitosan 2% effect on prohibiting the growth of candida albicans on heatcured acrylic resin

Angela Evelyn, Dahlia Sutanto, Elizabeth Tiffany
Faculty of Dentistry Maranatha Christian University

Abstract

Maintaining acrylic denture hygiene is a necessary to prohibit the growth of several oral fungi such as Candida albicans. Candida albicans are the main etiological microorganism of denture stomatitis. One of the ways to clean denture is by immersion on synthetic denture cleaner liquid such as oxygenizing denture cleaners. However, synthetic denture cleaner have several limitation due to its biocompatibility on human body especially oral tissue. Chitosan is a derivate of chitin, a natural compound of sea creature exoskeleton. Chitosan have antifungi and antibacterial nature. The objective of this study is to evaluate the antifungi efectifity of chitosan 2% on acrylic heatcured and compare it with oxygenizing denture cleaner. Aquades is used as a control. The sample consists of 15 acrylic heatcured bars (10x10x2 mm) prepared by contamination on Candida albicans suspensions at temperature 37°C for 24 hours and immersed on 3 different treatments wich are chitosan 2%, oxygenizing denture cleanser, and aquades as control and then, the solutions are being vibrate and put into sabouraud dextrose agar medium. The colony of Candida albicans counted manually. Result shows, highest mean of Candida albicans colony on aquades group (365,66 CFU/plate), followed by oxygenizing denture cleanser treatment (178,33 CFU/plate). The smallest number colony of Candida albicans are found at chitosan 2% treatment (45,33 CFU/plate). Statistical analysis using ANOVA one way shows $F=9.826$ and $p=0$, this means, there is minimal one pair of groups with very significant differential ($p<0,01$) which are chitosan 2% and oxygenizing denture cleanser compared to aquades as control. The difference between those two treatments also significant. Conclusions of this study is that chitosan 2% solution have a sifnificant effect on prohibiting the growth of Candida albicans colony on acrylic heatcured denture base materials. The effectivity of this solution is significantly higher than oxygenizing denture cleanser treatment.

Korespondensi:

Angela Evelyn
Faculty of Dentistry
Maranatha Christian University
angela_evelyna@yahoo.co.id

Keywords: Chitosan, oxygenizing denture cleaners, Candida albicans

Efek Larutan *Chitosan* 2% Dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida Albicans* Pada Resin Akrilik *Heat-Cured*

Abstrak

Kebersihan gigi tiruan akrilik perlu dijaga untuk mencegah pertumbuhan *Candida albicans* yang merupakan penyebab utama *denture stomatitis*. Salah satu cara membersihkan gigi tiruan adalah melalui perendaman pada larutan pembersih gigi tiruan sintetis *oxygenizing*, namun bahan kimia yang digunakan dapat berbahaya bagi tubuh jika tertelan. *Chitosan* merupakan bahan alami yang berasal dari kitin hewan laut. *Chitosan* memiliki efektifitas antifungi dan antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektifitas antifungi larutan kitosan 2% dan membandingkannya dengan larutan perendam gigi tiruan *oxygenizing* serta aquades sebagai kontrol. Sampel penelitian berupa 15 buah plat resin akrilik *heat-cured* (10x10x2 mm) yang diberi perlakuan kontaminasi *candida albicans* selama 24 jam pada suhu 37°C lalu dibagi menjadi tiga kelompok yaitu, *chitosan* 2%, larutan perendam gigi tiruan buatan pabrik, dan aquades. Larutan divibrasi, diencerkan, kemudian dimasukkan dalam medium *sabouraud dextrose agar* untuk kemudian dihitung jumlah koloni *candida albicans*. Hasil penelitian menunjukkan nilai rerata koloni *Candida albicans* terbesar terdapat pada kelompok kontrol yaitu lebih dari 365,66 CFU/plate, diikuti oleh kelompok larutan pembersih gigi tiruan sintetis sebesar 178,33 CFU/plate dan *chitosan* 2% yang paling sedikit yaitu 45,33 CFU/plate. Analisis data menggunakan uji statistik *one way ANOVA* dilanjutkan uji *tukey HSD* menunjukkan nilai F sebesar 99,826 dan p sebesar 0. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat minimal sepasang kelompok dengan jumlah koloni yang berbeda sangat signifikan ($p < 0,01$) yaitu perlakuan *chitosan* dan larutan perendam gigi tiruan *oxygenizing* terhadap jumlah koloni *Candida albicans* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan antara perlakuan *chitosan* 2% dan larutan pembersih gigi tiruan *oxygenizing* juga signifikan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah larutan *chitosan* 2% dapat secara efektif menghambat pertumbuhan *candida albicans* pada lempeng resin akrilik *heat-cured*. Efektifitas antifungi larutan *chitosan* 2% lebih tinggi jika dibandingkan larutan perendam gigi tiruan *oxygenizing*.

Kata kunci : *Chitosan*, Larutan Perendam Gigi Tiruan *Oxygenizing*, *Candida albicans*

Pendahuluan

Kondisi kehilangan gigi merupakan keadaan yang sangat mengganggu fungsi jaringan mulut pasien, baik itu fungsi mastikasi, fonetik, estetik bahkan psikologis pasien. Keadaan kehilangan gigi harus segera ditanggulangi dengan pembuatan gigi tiruan. Gigi tiruan yang umum digunakan adalah gigi tiruan lepasan dengan landasan berbahan resin akrilik (*polymethylmethacrylate*).¹

Terdapat beberapa jenis resin akrilik berdasarkan metode polimerisasinya. Resin akrilik yang banyak digunakan sebagai landasan gigi tiruan lepasan adalah resin akrilik *heat-cured*. Jenis resin ini terpolimerisasi dengan perantaraan panas. Resin akrilik *heat-cured* banyak dipilih karena harganya yang sangat terjangkau, penampilannya yang dapat menirukan jaringan mulut asli dengan baik serta sifat mekanis dan kestabilan dimensionalnya yang lebih baik dari resin akrilik *self-cured*.^{2,3}

Syarat bahan landasan gigi tiruan yang baik antara lain adalah harus biokompatibel dengan jaringan rongga mulut sehingga tidak menimbulkan reaksi alergi, hipersensitifitas dan tidak toksik terhadap jaringan serta mudah dibersihkan agar tidak menjadi tempat retensi plak dan debris makanan.⁴

Resin akrilik seperti layaknya plastik atau jenis resin lainnya memiliki tekstur permukaan berporus dalam skala mikro

sehingga menyebabkan perlekatan plak dan debris makanan yang dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme patogen rongga mulut yaitu antara lain jamur atau *Candida albicans*. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya *denture stomatitis* seperti yang dapat dilihat pada gambar 1^{5,6,7}

Denture stomatitis merupakan inflamasi yang ditandai dengan eritema atau daerah berwarna kemerahan pada mukosa oral yang berkontak langsung dengan landasan gigi tiruan. Hasil studi menyebutkan, 15-70% pemakai gigi tiruan mengalami kondisi ini, prevalensi terbesar terdapat pada manula dan perempuan. Faktor pencetusnya antara lain kurang terjaganya kebersihan gigi tiruan, penggunaan gigi tiruan yang terus menerus sewaktu tidur, akumulasi plak pada permukaan gigi tiruan, serta kontaminasi bakteri dan jamur pada gigi tiruan. Selain itu, *fit* gigi tiruan yang kurang baik dapat meningkatkan terjadinya trauma pada mukosa. Semua faktor ini dapat menyebabkan peningkatan kemampuan *Candida albicans* untuk berkolonisasi baik pada gigi tiruan dan permukaan mukosa oral, dimana fungi tersebut bertindak sebagai patogen oportunistik. Spesies *Candida* terdapat pada rongga mulut hampir semua pasien. *Candida albicans* merupakan spesies dominan yang terdapat pada rongga mulut jika dibandingkan dengan spesies *Candida* lainnya.⁸

Agen antifungi dapat mengurangi kontaminasi *Candida albicans* dan mengurangi simptom stomatitis, tapi jika gigi tiruan tetap terkontaminasi dan kebersihannya tidak terjaga maka stomatitis dapat rekuren ketika terapi antifungi dihentikan. Perkembangan baru tertuju pada bahan baru yang berfokus untuk mengurangi perkembangan perlekatan biofilm. Hal ini dapat membantu mengurangi kolonisasi jamur dan mikroba dan dapat mengurangi prevalensi *denture stomatitis* dengan kebersihan gigi tiruan yang adekuat.⁸

Denture stomatitis dapat dicegah melalui pembersihan landasan gigi tiruan secara benar dan teratur. Salah satu metode pembersihan gigi tiruan yang paling mudah dan umum digunakan adalah melalui



Gambar 1. Denture Stomatitis pada Palatum Pasien yang Menggunakan Gigi Tiruan Sebagian Lepas⁵

perendaman pada bahan rendam pembersih gigi tiruan yang dijual bebas di pasaran atau yang biasa disebut *chemical denture cleanser*. Bahan kimia perendam gigi tiruan biasanya bersifat antiseptik dan desinfektan, namun bahan ini memiliki kekurangan yaitu kurang biokompatibel dengan jaringan tubuh karena terbuat dari unsur-unsur kimia sintetis dan harganya relatif mahal sehingga tidak dapat dijangkau oleh seluruh lapisan masyarakat terutama masyarakat berekonomi rendah.^{4,9}

Denture Cleanser yang banyak dijual di pasaran yaitu *oxygenating cleanser* yang tersedia dalam bentuk bubuk dan tablet. Komposisi dari bahan ini adalah bahan kimia seperti senyawa alkali, deterjen, sodium perborat dan bahan tambahan lainnya. Bahan ini digunakan dengan cara dicampur dengan air sehingga sodium perborat akan terurai dan menghasilkan *peroxyde* yang akan melepaskan oksigen yang mampu melarutkan deposit organik dan membunuh mikroorganisme.⁴

Chitosan (kitosan) merupakan derivat kitin biasanya terbuat dari cangkang hewan-hewan laut merupakan produk bumi yang melimpah keberadaannya di Indonesia, karena negara kita adalah negara maritim. *Chitosan* telah teruji memiliki sifat antifungi dan antimikroba yang sangat baik. *Chitosan* juga banyak digunakan di bidang medis salah satunya sebagai suplemen diet. Penggunaan yang luas di bidang medis ini dikarenakan sifatnya yang *hypoallergenic*, *biodegradable*, antimikroba dan antifungi. Belum pernah dilakukan pengujian efektifitas antimikroba dan antifungi larutan kitosan sebagai bahan perendam gigi tiruan sebagian lepasan.¹⁰⁻¹³

Berdasarkan latar belakang dan uraian tersebut di atas maka penulis melakukan pengujian efek antifungi larutan *chitosan* pada resin akrilik *heatcured*.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk membandingkan efektifitas antifungi perendaman lempeng akrilik *heatcured* pada larutan *chitosan* 2%, larutan pembersih gigi

tiruan sintetis dan aquades untuk dilihat perbedaannya.

Sampel penelitian berupa plat resin akrilik *heatcured* berukuran 10 x 10 x 2 mm sejumlah 15 buah dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan. Kelompok I sejumlah 5 buah plat resin akrilik yang direndam pada larutan *chitosan* 2%, kelompok II sejumlah 5 buah plat resin akrilik yang direndam pada larutan bahan pembersih gigi tiruan *oxygenizing* yang tersedia di pasaran (Polident® tablet). Kelompok III merupakan kelompok kontrol dimana 5 buah plat akrilik *heatcured* direndam pada aquades steril.

Prosedur penelitian ini dibagi dalam tiga tahap yaitu, persiapan yang berupa pembuatan spesimen plat akrilik *heatcured*, pembuatan larutan *chitosan* 2% yang kemudian dilanjutkan dengan kontaminasi *Candida albicans* dan perendaman pada 3 kelompok larutan yang berbeda (*chitosan* 2%, Polident®, dan aquades steril) untuk kemudian ditanam pada medium agar. Langkah terakhir adalah penghitungan koloni *Candida albicans* pada masing-masing media kelompok.¹⁴

Plat akrilik *heatcured* dibuat sesuai dengan petunjuk pabrik (Stellon®) dengan metode *lost wax technique* pada kuvet berukuran kecil. Larutan *chitosan* 2 % dibuat dengan cara mencampur 2 gram bubuk *chitosan* yang sudah tersedia di pasaran dengan asam asetat 2% hingga volume nya mencapai 100 ml, lalu dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* hingga keseluruhan bubuk *chitosan* larut dan tidak terdapat endapan.¹⁴

Koloni *Candida albicans* diperoleh dari biakan yang tersedia di laboratorium Mikrobiologi. Seluruh plat resin akrilik (15 buah) direndam dalam aquades selama 24 jam untuk melepaskan sisa-sisa monomer, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave*. Seluruh plat akrilik kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi *Candida albicans* untuk diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah kontaminasi, plat dibagi menjadi 3 kelompok yang sama banyak (5 buah) untuk mendapatkan 3

perlakuan perendaman berbeda seperti yang telah disebutkan sebelumnya. Masing-masing kelompok berupa 10 ml larutan pada 3 tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi divibrasi menggunakan *vortex mixer* selama 1 menit untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada plat dan setiap tabung dilakukan pengenceran sampai. ¹⁴



Gambar 2. Koloni *Candida albicans* yang diberi perlakuan perendaman pada larutan Chitosan 2%



Gambar 3. Koloni *Candida albicans* yang diberi perlakuan perendaman pada larutan pembersih gigi tiruan oxygenizing Polident®



Gambar 4. Koloni *Candida albicans* yang diberi perlakuan perendaman pada aquades

Sampel penelitian berupa 0,1 ml larutan uji diambil dari 3 kelompok tabung reaksi yang berbeda untuk ditanam pada medium *Sabouraud Dextrose Agar*, kemudian dilakukan *spreading* dan inkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 48 jam untuk kemudian dihitung jumlah koloni *Candida albicans* secara visual. Dilakukan pengulangan untuk masing-masing kelompok sebanyak tiga kali. ¹⁴

Hasil

Hasil penelitian berupa jumlah koloni *Candida albicans* pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* menunjukkan hasil seperti gambar di bawah ini. Koloni *Candida albicans* paling sedikit pada medium yang diberi perlakuan perendaman pada *Chitosan 2%* (gambar 2), lebih banyak pada perlakuan perendaman larutan pembersih gigi tiruan *oxygenizing Polident®* (gambar 3) dan yang paling banyak pada larutan aquades steril (gambar 4).

Perhitungan jumlah koloni *Candida albicans* pada 3 perlakuan perendaman pada larutan yang berbeda menunjukkan jumlah koloni terbesar pada perlakuan 3 yaitu pada *aquades* sebagai kontrol dengan jumlah rerata koloni lebih dari 300 CFU/plate, diikuti dengan perlakuan 2 yaitu perendaman pada larutan pembersih gigi tiruan *oxygenizing* dengan rerata sebesar 178,33 CFU/plate. Perlakuan 1 memiliki jumlah rerata koloni *Candida albicans* yang paling kecil yaitu 45,33 CFU/plate. Data sebaran jumlah koloni *Candida albicans* dan rerata nya dapat dilihat pada tabel 1.

Hasil penelitian diolah secara statistik menggunakan uji normalitas dengan metode Shapiro Wilk dan menunjukkan semua nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi secara normal. Berdasarkan perhitungan tersebut data memenuhi prasyarat uji ANOVA satu arah, seperti yang terlihat pada tabel 2.

Hasil uji statistik ANOVA satu arah menunjukkan nilai F sebesar 99,826 dan p sebesar 0. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat minimal sepasang kelompok dengan

Tabel 1 Hasil dan Rata-Rata Perhitungan Jumlah Koloni *Candida albicans* yang diberi perlakuan Kitosan 2%, Polident, dan Aquades dalam satuan CFU/mL

Pengulangan	Kitosan 2% CFU/plate	Polident CFU/plate	Aquades CFU/plate
1	39	196	380
2	44	212	349
3	53	127	368
Rata-rata	45,33	178,33	365,66

Tabel 2. Hasil Uji Statistik ANOVA satu arah

Pengulangan	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	155396.222	2	77698.111	99.826	.000
Within Groups	4670.000	6	778.333		
Total	160066.222	8			

Tabel 3. Hasil Uji Statistik Tukey HSD

Perlakuan	Kitosan 2%	Polident	Aquades
Kitosan 2%		0.003*	0.000*
Polident			0.000*
Aquades			

jumlah koloni yang berbeda sangat signifikan ($p < 0,01$). Uji lanjutan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda dilakukan dengan uji Tukey HSD, seperti yang terlihat pada tabel 3. Besaran $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan, sedangkan $p < 0,01$ menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan.

Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek *chitosan* terhadap pertumbuhan *Candida albicans* pada plat akrilik *heatcured* dan membandingkannya dengan larutan perendaman gigi tiruan *oxygenizing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata koloni *Candida albicans* terbesar terdapat pada perendaman dengan aquades sebagai kontrol 365,56 CFU/plate, diikuti dengan perlakuan perendaman pada larutan pembersih gigi tiruan *oxygenizing* (Polident) 178,33 CFU/plate dan jumlah rerata koloni *Candida albicans* yang paling sedikit terdapat pada kelompok perlakuan *chitosan* 2% yaitu 45,33 CFU/plate. Hal ini menunjukkan

bahwa larutan *chitosan* memiliki efek yang paling baik dalam mencegah pertumbuhan jamur *Candida albicans* pada lempeng akrilik *heatcured*. Efek atau pengaruh perendaman pada larutan *chitosan* terlihat berbeda secara signifikan dengan larutan perendam gigi tiruan *oxygenizing*, dan terlihat berbeda sangat signifikan dengan larutan aquades sebagai kontrol.

Metode pembersihan gigi tiruan yang paling banyak digunakan adalah metode imersi. Bahan perendam gigi tiruan *oxygenizing* mengandung gugus alkaline, deterjen, sodium perborate, dan perasa buatan. Ketika dilarutkan dalam air, sodium perborate akan terdekomposisi dan membentuk larutan alkaline peroxide. Larutan peroxide ini secara bertahap akan melepaskan oksigen yang berfungsi untuk menghilangkan debris secara mekanis.²

Chitosan atau kitosan (1-4,2-amino-2-deoxy- β -D-glucan) merupakan polimer alam, polisakarida kedua terbesar di dunia yang disintesis dari eksoskeleton hewan golongan crustacea dan dinding sel fungi. *Chitosan* digunakan secara luas di bidang medis karena

sifatnya yang *hypoallergenic, biodegradable*, antimikroba, dan antifungi. Chitosan memiliki sifat antifungi karena memiliki gugus aktif yang akan berikatan dengan mikroorganisme.^{10,11}

Aktifitas antifungi *chitosan* dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain berat molekul, derajat substitusi, konsentrasi, tipe fungi, dan tipe gugus fungsional chitosan. Semakin rendah berat molekul kitosan, makin rendah viskositasnya, makin mudah terabsorpsi ke resin akrilik. Aktifitas antifungi chitosan disebabkan oleh sifat kationik substansi tersebut. Terdapat beberapa mekanisme antifungi chitosan salah satunya adalah teori yang menyebutkan bahwa membran plasma fungi merupakan target utama chitosan. Muatan positif dari kitosan menyebabkannya mampu berinteraksi dengan muatan negatif dari komponen fosfolipid pada membran fungi. Hal ini menyebabkan peningkatan permeabilitas membran dan menyebabkan kebocoran isi sel fungi yang akhirnya mengakibatkan kematian sel.^{15,16}

Penelitian ini menggunakan larutan *chitosan* dengan konsentrasi 2% karena dianggap merupakan konsentrasi yang paling optimal untuk dapat menghasilkan efek antifungi tapi cukup ringan sehingga tidak menimbulkan efek biologis yang merugikan bagi jaringan pendukung gigi tiruan dan tidak mengakibatkan perubahan sifat mekanis bahan gigi tiruan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan beberapa konsentrasi berbeda¹⁷

Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa chitosan 2% dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada bahan landasan gigi tiruan akrilik *heatcured*. Chitosan 2% memiliki efek yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* jika dibandingkan dengan larutan pembersih gigi tiruan *oxygenizing*.

Daftar Pustaka

1. The Academy of Denture Prosthetics.

2005. *The Glossary of Prosthodontics Terms*. Edisi ke-8. J Prosthet Dent: 94(1): Hlm. 10-92
2. Anusavice. K. J. 2006. *Philips' Science of Dental Materials*. Edisi ke-11. Elseviers Saunders, St. Louis, Missouri: Hlm. 72, 74, 165-166, 404-405
3. Darvell. B. W. 2000. *Materials Science for Dentistry*. Edisi ke-6. BW Darvell, Hongkong: Hlm. 20-25, 112
4. Ecket, Jacob, Fenton, Mericske, Stern. 2004. *Prosthodontic Treatment for Edentulous Patients*. 12th ed. Louis: Mosby Inc: Hlm. 190-207
5. Gharechahi M, Moosavi H, Forghani M. 2012. *Effect of Surface Roughness and Materials Composition on Biofilm Formation*. Journal of Biomaterial and Nanobiotechnology: Hlm. (3): 541-546
6. Young B, Jose A, Cameron D, McCord F, Murray C, Bagg J, dkk. 2009. *Attachment of Candida albicans to denture base acrylic resin processed by three different methods*. The International Journal of Prosthodontic: Hlm. 22(5): 488-489
7. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, dkk. 2011. *Candida-associated denture stomatitis*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal: Hlm. 16(1): e139-43
8. Gendreau L, Zvi G L. 2011. *Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis*. Journal of Prosthodontics. Vol 20: Hlm. 251-260
9. Lee HE, Li CY, Chang HW, Yang YH, Wu JH. 2011. *Effect of Different Denture Cleaning Methods to Remove Candida albicans from Acrylic Resin Denture Based Material*. Journal of Dental Sciences: Hlm. (6): 216-20
10. Kim SK. *Chitin, Chitosan, Oligosacharides and Their Derivates: Biological Activities and Their Applications*; 2011: Boca Raton: CRC Press-Taylor and Francis Group.
11. Tiayaboonchai W. 2003. *Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery*. Naresuan University Journal: Hlm. 11(3):51-66
12. Sano H, Shibasaki KI, Matsukubo T, Takaesu Y. 2001. *Comparison of The*

- Activity of Four Chitosan Derivatives in Reducing Initial Adherence of Oral Bacteria Onto Tooth Surfaces.* Bull. Tokyo dent. Coll: Hlm. 42(4): 243-249
13. Sano, H., Shibasaki, K.I., Matsukubo, T., Takaesu, Y. 2001. *Effect of Rinsing with Phosphorylated Chitosan on Four-day Plaque Growth.* Bull. Tokyo dent. Coll: Hlm. 42(4): 251-256
 14. Clara M. 2014. *Pengaruh ekstrak Kulit Leon dalam Menghambat Pertumbuhan Candida albicans pada Landasan Gigi Tiruan Resin Akrilik Heatcured.* FKG UKM.
 15. Ing LY, Noraziah MZ, Atif S, Haliza K. 2012. *Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties.* Int. J Biomater 632698
 16. Ismiyati T, Siswa S. 2014. *Antifungal of Thermoplastic Nylon Denture Base Plate.* Journal of Chitin and Chitosan Science. Vol.2: Hlm. 216-222
 17. Mahatmanti FW, Warlan S, Wisnu S. 2010. *Sintesis Kitosan dan Pemanfaatannya sebagai Antimikroba Ikan Segar.* Jurnal unnes.ac.id