

## Pemanfaatan Kitosan Larut Air sebagai *Hand Sanitizer* Antiseptik Utilization of Water-Soluble Chitosan as Antiseptic Hand Sanitizer

Anies Chamidah\*, Christina Nur Widiyanti & Nahda Nur Fabiyani.

Faculty of Fisheries and Marine Science, Universitas Brawijaya, Malang

\*Corresponding author, email: achamidah@ub.ac.id

Submitted 13 September 2018 Revised 02 February 2019 Accepted 01 June 2019

**Abstrak** Limbah udang yang diproduksi oleh industri pengolahan pemanfaatannya oleh *home industry* kecil masih sangat terbatas, seperti dibuat menjadi kerupuk, petis dan pakan ternak meskipun limbah ini dapat dibuat sebagai kitosan. Pemanfaatan kitosan sering terkendala karena kitosan tidak larut dalam air yang disebabkan oleh panjangnya rantai molekuler. Untuk mengoptimalkan pemanfaatan kitosan, perlu dilakukan depolimerisasi misalnya menggunakan  $H_2O_2$ . Depolimerisasi kitosan memungkinkan kitosan menjadi larut dalam air dan memiliki kemampuan antibakteri yang tinggi, yang dapat digunakan sebagai antiseptik pembersih tangan yang umumnya dibuat dari bahan sintetis. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental yang meliputi pembuatan kitosan yang larut dalam air dengan parameter uji deasetilasi, kelarutan, kadar air, dan rendemen. Selanjutnya pembuatan *hand sanitizer* yang diuji secara *in vitro* dan *in vivo*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan larut air dapat dibuat pada konsentrasi  $H_2O_2$  13% pada 40°C dengan nilai DD 94,21%, kelarutan 90%, kadar air 10,60% dan rendemen 3,5%. Setelah menjadi *hand sanitizer* mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi 120 mg/ml, dengan zona bening masing-masing 19,53 mm dan 21,12 mm, yang tergolong kuat. Menghasilkan nilai MIC 0,28% dan 0,27%, dan nilai MBC 1,12% dan 1,08%, dan tanpa menyebabkan iritasi atau edema pada kulit tikus.

**Kata kunci** *Hand sanitizer*; kitosan larut air; *in vitro*; *in vivo*

**Abstract** Shrimp wastes produced by manufacturers are mostly limited to be utilized by small industries. They only can turn the waste into chips and shrimp pastes even though it can be used as chitosan. The scarcity of shrimp waste utilized as chitosan is often constrained due to the lack of chitosan dissolve in water caused by the length of the molecular chain. In order to optimize the chitosan utilization, depolymerization is used; such as using  $H_2O_2$ . Chitosan depolymerization enables chitosan to be water soluble and has a high antibacterial ability, which can be applied as an antiseptic of hand sanitizer which has been derived from synthetic materials. The used method is an experimental method which includes the processing of making water-soluble chitosan with test parameters of deacetylation, solubility, moisture content, and yield. Furthermore, the manufacture of hand sanitizers is carried out *in vitro* and *in vivo*. The results showed that water-soluble chitosan can be made at 13%  $H_2O_2$  concentration at 40°C with deacetylation degree 94.21%, 90% solubility, 10.60% moisture content and 3.5% yield. Moreover, after becoming a hand sanitizer, it was able to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria at concentrations of 120 mg/ml, respectively 19.53 mm and 21.12 mm, which were relatively strong. Resulted in MIC values 0.28% and 0.27%, and MBC values 1.12% and 1.08%, and also without causing irritation or edema on mouse skin.

**Keywords** Hand sanitizer; water-soluble chitosan; *in vitro*; *in vivo*

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan pengekspor udang terbesar ketiga didunia. Umumnya ekspor udang dalam bentuk tanpa kepala atau tanpa kulit, menyisahkan limbah pengolahan udang yang tinggi (30-40%, terdiri dari kulit, kepala dan ekor) yang dapat menimbulkan masalah pencemaran lingkungan bila tidak diolah dengan benar (Andriana *et al.*, 2001). Pemanfaatan limbah udang selama ini masih belum optimal, hanya sebagai pakan, petis dan kerupuk yang bernilai ekonomi rendah. Pemanfaatan lain limbah kulit udang, dapat dijadikan bahan untuk pembuatan kitin dan kitosan (Nandes, 2011).

Kulit udang mengandung protein sebesar 25-40 %, kitin 20-30 % dan kalsium karbonat 45-50 % (Domepeipen *et al.*, 2016). Kitin adalah polimer linier dengan rantai panjang tanpa rantai samping yang tersusun atas 2-asetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukosa yang berikatan glikosidik 1-4 (Nadarajah, 2005). Sedangkan kitosan terbentuk ketika beberapa gugus asetil dihilangkan dari kitin melalui proses deasetilasi parsial (Savant *et al.*, 2000). Senyawa ini merupakan polisakarida yang dibentuk dari N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukosa melalui ikatan  $\beta$ -(1,4) glikosida (Savant *et al.*, 2000). Kitosan mempunyai reaktivitas lebih tinggi daripada kitin karena memiliki gugus amina bebas yang bersifat nukleofil kuat. Hal ini menyebabkan kitosan lebih sering diaplikasikan dalam dunia industri (Marganov, 2003).

Kitosan larut dalam pelarut organik (asam format, asam asetat, asam tartat dan asam sitrat) pada pH kurang dari 6,5 (Tiyaboonchai, 2003). Lebih lanjut Sugita (2009), kelarutan kitosan yang paling baik dalam larutan asam asetat 2% yang dipengaruhi oleh derajat deasetilasi dan rotasi spesifiknya. Tanasale et al. (2016) menyatakan bahwa bobot molekul yang tinggi dan panjangnya rantai kitosan yang mengakibatkannya sulit larut air. Disisi lain, kelarutan merupakan karakteristik penting untuk pemanfaatan kitosan (Tanasale et al., 2016). Keterbatasan kelarutan kitosan menyebabkan pemanfaatannya kurang optimal. Oleh karena itu, perlu dilakukan modifikasi dengan memutus rantai kitosan. Salah satu metode depolimerisasi menurut Tanasale et al. (2016) dengan menggunakan  $H_2O_2$ .

Depolimerisasi ditentukan oleh konsentrasi dan suhu larutan  $H_2O_2$  (Makuuchi, 2008). Suhu yang semakin meningkat akan mempercepat proses depolimerisasi rantai utama kitosan sehingga BM kitosan yang dihasilkan menurun. Semakin rendah BM kitosan maka tingkat kelarutannya semakin meningkat (Tanasale et al., 2016). Ditambahkan Du et al. (2002) semakin tinggi konsentrasi  $H_2O_2$  dapat mempercepat proses degradasi rantai utama kitosan dan juga mengakibatkan perubahan struktur kimia, seperti pembentukan ikatan karboksil.

Kitosan larut air menurut Liu et al. (2001) efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan kitosan alami, karena kitosan larut air memiliki derajat deasetilasi (DD) yang tinggi dan BM yang rendah. Semakin tinggi DD cenderung memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat. Antibakteri adalah senyawa biologis atau kimia yang dapat mengganggu pertumbuhan dan aktivitas bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Lebih lanjut Chotiah (2013) menyatakan bahwa antibakteri dapat digunakan sebagai pencegahan terhadap berbagai infeksi bakteri pathogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis* (Purwantoro et al., 2010).

Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatannya sebagai zat antibakteri, serta pengaplikasiannya menjadi *hand sanitizer*, yaitu salah satu bentuk antiseptik yang banyak digunakan di masyarakat untuk membersihkan tangan dari bakteri. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi kemampuan kitosan larut air sebagai antibakterial sekaligus pengaplikasiannya sebagai *hand sanitizer*.

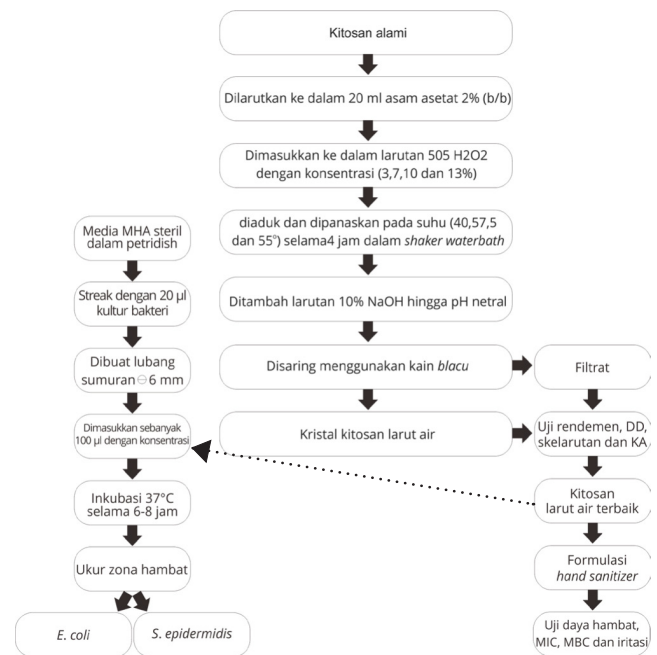
## BAHAN DAN METODE

### Bahan baku dan bahan pembantu

Kitosan dari udang *vaname*, aquadest, HCl 92%, NaOH 99%,  $H_2O_2$  50%, asam asetat glasial, *cotton swap*, metal parabean, polysorbate 20, trietanolamin (TEA), koragen odoris, eter (sigma), Natrium Agar, Mueller Hinton Agar, Natrium Broth (Oxoid), tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*), air, tissu, kertas label, plastik wrap, kain blacu, kertas saring, aluminium foil, kasa, plastik, dan spirtus.

### Parameter uji

Derajat deasetilasi, kelarutan, kadar air dan rendemen, penentuan daya hambat (zona bening), MIC dan MBC metode Bloomfield dan pengujian *in vivo* iritasi permanen.



Gambar 1. Diagram alir proses penelitian.

### Tata laksana penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan kitosan larut air menggunakan kitosan alami dengan kombinasi perlakuan konsentrasi  $H_2O_2$  (3,7,10 dan 13%) dan suhu pemanasan (40, 47,5 dan 55°C) yang diulang sebanyak 3 kali. Kemudian diuji rendemen, DD dan kadar air serta tingkat kelarutannya. Hasil kitosan larut air terbaik diuji kemampuannya sebagai anti bakterial terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli* dengan melihat zona hambat terbesar dan MIC serta MBCnya. Kombinasi perlakuan terbaik digunakan untuk membuat formulasi *hand sanitizer* kemudian diuji zona hambat, MIC, MBC serta daya iritasinya. Untuk memudahkan dibuat diagram alir seperti terlihat pada Gambar 1 di atas.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Derajat Deasetilasi

Derajat deasetilasi (DD) adalah karakteristik penting karena dapat mempengaruhi kualitas kitosan larut air (Bahri et al., 2015). Sedangkan Knoor (1982) menyatakan bahwa DD merupakan parameter mutu kitosan yang menunjukkan persentase gugus asetil yang dapat dihilangkan dari rendemen kitin maupun kitosan. Hasil uji Anova DD terdapat interaksi antara suhu dan konsentrasi yang berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kitosan larut air yang dihasilkan, seperti terlihat pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1, semakin tinggi suhu pemanasan pada konsentrasi  $H_2O_2$  yang sama terjadi penurunan nilai DD. Hal ini karena suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan tingkat kelarutan termasuk kualitas kitosan larut air (Tanasale et al., 2006). Sebaliknya dengan konsentrasi  $H_2O_2$  yang semakin tinggi nilai DD semakin tinggi, hal ini disebabkan karena  $H_2O_2$  dapat mempercepat proses degradasi rantai utama kitosan (Du et al., 2002), sehingga gugus asetil yang terdapat pada kitosan larut air menurun dan semakin banyak jumlah gugus amina. Semakin tinggi

DD, maka gugus asetil dari kitosan semakin rendah sehingga interaksi antar ion dan ikatan hidrogennya akan semakin kuat. Pelepasan gugus asetil dari kitosan menyebabkan kitosan bermuatan positif sehingga mampu mengikat senyawa bermuatan negatif (Rochima, 2007). Nilai DD tertinggi pada perlakuan K4T1 dengan konsentrasi  $H_2O_2$  13% dan suhu 40 C sebesar 94,21% Nilai DD kitosan larut air lebih besar dibandingkan kitosan alami yaitu 75%. (Islam *et al.*, 2011) dan 74,26% (Basmal *et al.*, 2007).

Tabel 1. Hasil uji mutu kitosan larut air.

Perlakuan	DD	Kelarutan	Kadar Air	Rendemen
K1T1	36,86 <sup>b</sup>	84,07 <sup>d</sup>	6,60 <sup>a</sup>	5,61 <sup>a</sup>
K1T2	56,46 <sup>f</sup>	50,83 <sup>h</sup>	8,37 <sup>b</sup>	2,28 <sup>cd</sup>
K1T3	35,40 <sup>i</sup>	25,37 <sup>i</sup>	9,27 <sup>c</sup>	1,52 <sup>f</sup>
K2T1	36,44 <sup>bc</sup>	90,00 <sup>c</sup>	8,20 <sup>b</sup>	3,20 <sup>c</sup>
K2T2	48,32 <sup>de</sup>	70,33 <sup>g</sup>	10,43 <sup>cd</sup>	4,22 <sup>b</sup>
K2T3	48,09 <sup>d</sup>	40,97 <sup>i</sup>	9,80 <sup>cd</sup>	1,53 <sup>e</sup>
K3T1	45,22 <sup>c</sup>	92,10 <sup>b</sup>	9,07 <sup>bc</sup>	3,50 <sup>bc</sup>
K3T2	60,57 <sup>g</sup>	80,33 <sup>f</sup>	10,20 <sup>cd</sup>	1,93 <sup>e</sup>
K3T3	49,61 <sup>e</sup>	77,67 <sup>e</sup>	11,27 <sup>de</sup>	0,38 <sup>g</sup>
K4T1	94,21 <sup>a</sup>	94,00 <sup>a</sup>	10,60 <sup>d</sup>	4,67 <sup>a</sup>
K4T2	68,22 <sup>h</sup>	74,70 <sup>g</sup>	10,47 <sup>cd</sup>	2,56 <sup>d</sup>
K4T3	56,32 <sup>f</sup>	78,53 <sup>e</sup>	12,80 <sup>e</sup>	0,27 <sup>g</sup>

#### Keterangan:

K1T1 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan 40°C K3T1 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dan 40°C  
 K1T2 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan 47,5°C K3T2 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dan 47,5°C  
 K1T3 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan 55°C K3T3 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dan 55°C  
 K2T1 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7% dan 40°C K4T1 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13% dan 40°C  
 K2T2 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7% dan 47,5°C K4T2 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13% dan 47,5°C  
 K2T3 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7% dan 55°C K4T3 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13% dan 55°C

#### Kelarutan

Kelarutan merupakan parameter yang dapat dijadikan standar penilaian mutu kitosan, termasuk kitosan larut air. Semakin tinggi kelarutan maka aplikasinya akan semakin luas. Hasil uji Anova kelarutan menunjukkan bahwa suhu dan konsentrasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kitosan larut air yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 1. diatas, semakin tinggi suhu pemanasan pada konsentrasi  $H_2O_2$  yang sama terjadi penurunan kelarutan. Kondisi ini disebabkan karena suhu yang terlalu tinggi dapat merusak kitosan dan menurunkan nilai DD. Menurut Trimulyadi (2013), semakin tinggi DD maka semakin banyak gugus asetil yang berubah menjadi gugus amina sehingga mengurangi ikatan hidrogen antara gugus asetil dan hidroksil. Demikian juga konsentrasi  $H_2O_2$  semakin tinggi, maka kelarutannya semakin naik. Hal ini disebabkan karena konsentrasi  $H_2O_2$  yang tinggi dapat menyebabkan semakin kecilnya BM.  $H_2O_2$  merupakan oksidator kuat yang dapat memutus ikatan glikosidik pada kitosan, sehingga BM kitosan semakin rendah, semakin rendah BM maka semakin tinggi kelarutannya. Hasil analisis menunjukkan kelarutan tertinggi pada perlakuan K4T1 sebesar 94%, yang lebih besar dibandingkan kitosan alami yaitu 82,91% (Purbowati, 2016), dan pada karboksimetil kitosan sebesar 0,00198% (Kurniasih *et al.*, 2016).

#### Kadar Air

Kadar air (KA) merupakan parameter penting untuk menentukan mutu kitosan. Hasil uji kadar air kitosan larut air menunjukkan suhu dan konsentrasi  $H_2O_2$  berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kitosan larut air yang dihasilkan.

Berdasarkan Tabel 1. diatas semakin tinggi suhu dan konsentrasi  $H_2O_2$  maka kadar air kitosan larut air semakin tinggi. Hal ini disebabkan kitosan memiliki sifat higroskopis sehingga mudah menyerap uap air dari udara disekitarnya (Dompeipen *et al.*, 2016). Air yang terkandung dalam kitosan terikat pada gugus fungsional polimer kitosan, terutama gugus amina, N-asetil dan hidroksil melalui ikatan hidrogen. Saleh *et al.* (1994) menyatakan bahwa KA juga dipengaruhi oleh proses pengeringan, lama pengeringan, luas permukaan dan jumlah kitosan larut air yang dikeringkan. KA terendah terdapat pada K1T1 ( $H_2O_2$  3% dan 40°C) sebesar 6,6% dan tertinggi pada perlakuan K4T3 ( $H_2O_2$  10% dan 55°C) sebesar 12,80%. Standar mutu kitosan terhadap KA adalah  $\leq 10\%$  (Bastaman, 1989). kadar air kitosan larut air ini lebih rendah dibandingkan kitosan alami sebesar 8,91% (Zahiruddin *et al.*, 2008), karboksimetil kitosan sebesar 9,8% (Basmal *et al.*, 2007).

#### Rendemen

Rendemen merupakan presentase rasio antara hasil produk akhir terhadap bahan baku awal yang digunakan (Yudihapsari, 2009), yaitu rendemen transformasi kitosan menjadi kitosan larut air berdasarkan presentase berat kitosan larut air terhadap berat kitosan yang diperoleh (Zahiruddin *et al.*, 2008). Hasil Anova rendemen menunjukkan suhu dan konsentrasi berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kitosan larut air yang dihasilkan.

Berdasarkan Tabel 1. semakin tinggi suhu pemanasan dan konsentrasi  $H_2O_2$  rendemen yang diperoleh mengalami penurunan. Hal ini karena semakin tinggi konsentrasi  $H_2O_2$  menyebabkan BM kitosan semakin rendah. Hong *et al.* (1989) menyatakan  $H_2O_2$  yang tinggi dapat menyebabkan depolimerisasi rantai molekul kitosan yang akhirnya akan menyebabkan penurunan BM. Demikian juga suhu yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan partikel-partikel kitosan yang larut air menjadi lebih halus sehingga saat pemisahan filtrat dan residu banyak yang terikut pada filtratnya (Apriani *et al.*, 2012). Rendemen tertinggi pada perlakuan K1T1 sebesar 5,61% dan terendah pada perlakuan K4T3 sebesar 0,27%, nilai ini lebih kecil dibandingkan kitosan alami 15,26% (Zahiruddin *et al.*, 2008) dan karboksimetil kitosan yaitu 129,4% (Basmal *et al.*, 2007).

Dari hasil uji indeks efektifitas deGarmo untuk menentukan perlakuan yang layak digunakan sebagai antibakterial diperoleh perlakuan terbaik adalah perlakuan K4T1 (Konsentrasi  $H_2O_2$  13% dengan suhu 40°C). Sehingga digunakan sebagai sampel yang diujikan terhadap bakteri pathogen. Adapun bakteri yang digubakan adalah *S. epidermidis* dan *E. coli*.

#### Uji Aktivitas Antibakteri Kitosan larut Air

##### Metode Difusi

Uji Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode sumuran untuk mengukur besarnya diameter zona hambat yang dapat dilihat dari besarnya zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran. Metode ini digunakan karena menurut Azwar & Agoes (2010), dapat berdifusi maksimal sampai kedasar media. Ditambahkan Setiawan (2006), metode sumuran dapat menghasilkan zona bening yang lebih besar dan lebih kuat untuk menghambat bakteri. Berdasarkan analisa statistik penggunaan suhu dan konsentrasi  $H_2O_2$  pada pengujian aktivitas antibakteri



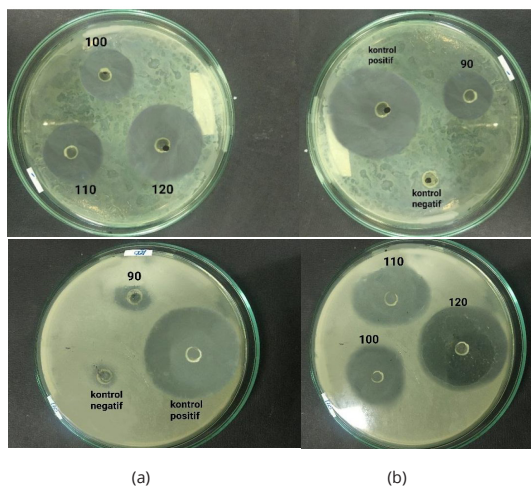
menunjukkan hasil berbeda nyata ( $p < 0.05$ ). Hasil rerata diameter zona hambat pada bakteri dapat dilihat pada Tabel 2. dan Gambar 2.

Tabel 2. Zona dan respon hambat kitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* dan *S. epidermidis*.

Konsentrasi (mg/ml)	Diameter Zona Hambat (mm)		Respon Hambat Pertumbuhan	
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>
0	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	Tidak ada	Tidak ada
90	13,53±0,39 <sup>d</sup>	15,90±0,80 <sup>e</sup>	Sedang	Kuat
100	14,35±0,40 <sup>d</sup>	17,60±0,81 <sup>d</sup>	Sedang	Kuat
110	16,93±0,38 <sup>c</sup>	19,33±0,54 <sup>c</sup>	Kuat	Kuat
120	19,53±0,46 <sup>b</sup>	21,12±0,85 <sup>b</sup>	Kuat	Sangat kuat
Kontrol (+)	24,33±0,98 <sup>e</sup>	26,83±0,39 <sup>f</sup>	Sangat kuat	Sangat kuat

#### Keterangan:

\*Notasi huruf yang sama pada satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata.



Gambar 2. Zona hambat kitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* (a) dan bakteri *S. epidermidis*.

Diameter zona hambat kitosan larut air tertinggi pada konsentrasi 120 mg/ml, yaitu 19,53±0,46 mm pada bakteri *E. coli* yang dikategorikan kuat, sedangkan untuk bakteri *S. epidermidis* sebesar 21,12±0,85 mm yang dikategorikan sangat kuat. Dari Tabel 2. menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan larut air, menghasilkan zona hambat yang semakin besar. Hal ini didukung oleh Pelczar & Chan (2010), semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya semakin kuat pula. Kontrol negatif menggunakan akuades tidak terdapat zona hambat pada kedua bakteri.

Pada konsentrasi yang sama, diameter zona hambat bakteri *E. coli* (Gram negatif) < *S. epidermidis* (Gram positif). Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan struktur dinding selnya. Pelczar & Chan (2010), menyatakan bahwa struktur penyusun dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dan berlapis tiga (lipoprotein pada lapisan luar, peptidoglikan di tengah dan lipopolisakarida dibagian dalam) sehingga mempersulit senyawa antibakteri masuk ke dalam selnya, menyebabkan zona bening yang dihasilkan lebih kecil. Struktur bakteri Gram negatif lebih tebal (15-80 nm) sedangkan bakteri Gram positif tipis (10-15 nm) (Pelczar & Chan, 1986). Kitosan larut air memiliki BM yang rendah dan DD yang tinggi, didukung dengan

konsentrasi yang tinggi sehingga menghasilkan diameter zona hambat yang besar. Menurut Oh et al. (2001), faktor utama yang mempengaruhi aktivitas antibakteri adalah BM dan DD Kitosan larut air. Didukung Tsai et al. (2004), BM Kitosan juga mempengaruhi aktivitas antibakteri, semakin rendah BM kitosan maka aktivitas antibakterinya semakin baik. Ditambahkan Park et al. (2004), kitosan larut air dengan DD 90% memiliki aktivitas antibakteri yang lebih efektif dibandingkan dengan yang memiliki DD < 70%. Dalam penelitian ini nilai DD kitosan larut air 95,85%, menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri yang lebih tinggi melawan bakteri *E. coli* dan *S. epidermidis*.

Mekanisme kitosan larut air sebagai antibakteri menurut Helander et al. (2001), dengan cara merusak perlindungan membran luar bakteri, terutama bakteri Gram negatif karena dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dan berlapis dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Senyawa ini menyebabkan terjadinya perubahan pada permukaan sel serta menutupi membran luar bakteri, sehingga fungsi barrier dari membran sel hilang. Ditambahkan Killay (2013) menyatakan bahwa afinitas antimikroba dari kitosan tergantung dari BM dan DD, oleh karena itu BM dan DD yang lebih besar menunjukkan aktifitas antibakteri yang lebih besar. Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan amoksisilin. Mekanisme kerja amoksisilin, yaitu menghambat sintesis protein dengan mencegah terikatnya tRNA di ribosom (Jawetz et al., 2001; Tenover, 2006).

#### Metode Dilusi

Uji aktivitas antibakteri kitosan larut air juga dilakukan untuk menentukan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). MIC adalah konsentrasi minimum senyawa antibakteri yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Sedangkan MBC (kelanjutan dari MIC), merupakan konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri. Uji keduanya menggunakan metode Bloomfield (1991), seperti terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai MIC dan MBC kitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* dan *S. epidermidis*.

Bakteri	Regresi Linear	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>E. coli</i>	$y = 58,363x - 6,5733$	0,28	1,12
<i>S. epidermidis</i>	$y = 75,996x - 5,8209$	0,27	1,08

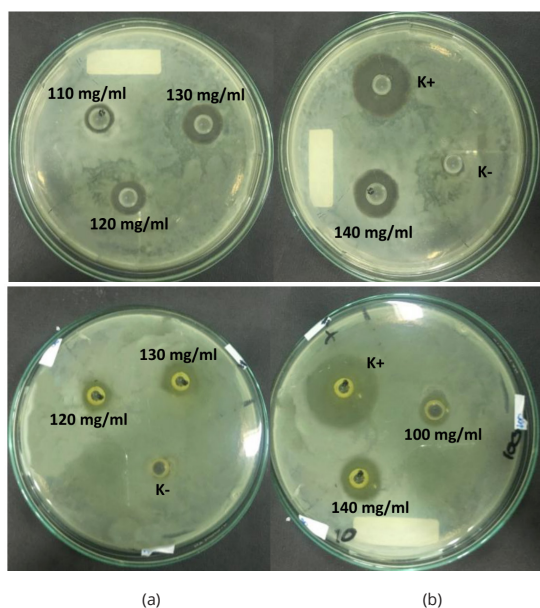
Berdasarkan Tabel 3. nilai MIC dari kitosan larut air terhadap *E. coli* sebesar 0,28 mg/ml, yang berarti pada konsentrasi tersebut senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*. Sedangkan nilai MBC-nya sebesar 1,12 mg/ml yang berarti pada konsentrasi tersebut senyawa ini mampu membunuh *E. coli*. Semakin rendah nilai MIC dan MBC, maka kemampuan suatu ekstrak untuk menghambat dan membunuh suatu bakteri semakin tinggi (Wei et al., 2011). Dibandingkan dengan MIC dan MBC kitosan alami masing-masing sebesar 1,3 mg/ml dan 1,7 mg/ml (Islam et al., 2001) maka nilai MIC dan MBC kitosan larut air lebih rendah, dengan demikian kemampuan senyawa ini untuk menghambat dan membunuh bakteri lebih tinggi.

*S. epidermidis* mempunyai nilai MIC sebesar 0,27 mg/ml yang berarti pada konsentrasi tersebut kitosan larut air mampu menghambat pertumbuhan *S. epidermidis*.

Sedangkan MBC-nya sebesar 1,08 mg/ml yang berarti senyawa ini pada konsentrasi tersebut sudah mampu membunuh *S. epidermidis*. Dibandingkan kitosan alami dengan nilai MIC dan MBC masing-masing 0,75 mg/ml dan 1,76 mg/ml (Safitri, 2016), maka kitosan larut air dengan konsentrasi lebih rendah sudah dapat menghambat dan membunuh *S. epidermidis*. Semakin rendah konsentrasi sebuah antibiotik terhadap suatu mikroba menurut Pramata (2005), maka sensitivitas dari bakteri akan semakin besar. *E. coli* dan *S. epidermidis* memiliki tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap kitosan larut air. Bakteri *E. coli* lebih resisten daripada *S. epidermidis*, hal ini disebabkan *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki dinding sel lebih kompleks.

**Uji Antibakteri Hand Sanitizer Kitosan Larut Air**

Uji antibakteri *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. epidermidis* menghasilkan zona bening sebesar 11,13-14,45 mm, sedangkan terhadap *E. coli* sebesar 7,73- 9,38 mm. Hasil analisa data menunjukkan bahwa antibakteri *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. epidermidis* maupun *E. coli* berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Zona hambat *hand sanitizer* konsentrasi terbaik terhadap *S. epidermidis* dan *E. coli* menggunakan *hand sanitizer* kitosan larut air dengan formula F0, F1 (110 mg/ml), F2 (120 mg/ml), F3 (130 mg/ml), F4 (140 mg/ml), dan kontrol positif menggunakan produk komersial *hand sanitizer*. Gambar hasil uji difusi sumuran *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. epidermidis* dan *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Zona hambat *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. epidermidis* (a) dan *E. coli* (b).

Pada Gambar 3<sup>a</sup>, dapat dilihat bahwa zona hambat terbesar terhadap *S. epidermidis* pada *hand sanitizer* konsentrasi 140 mg/ml sebesar 14,45 mm yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dengan konsentrasi 130 mg/ml yaitu sebesar 14,05 mm. Sedangkan Gambar 3<sup>b</sup>, dapat dilihat hal yang seirama, bahwa zona hambat terbesar *E. coli* yaitu pada *hand sanitizer* konsentrasi 140 mg/ml sebesar 9,38 mm. Dengan demikian pengaruh *hand sanitizer* terhadap *S. epidermidis* menghasilkan zona hambat lebih besar daripada *E. coli*. Hal ini berarti *hand sanitizer* kitosan larut

air lebih mudah terdifusi pada *S. epidermidis* (bakteri Gram positif) daripada *E. coli* (bakteri Gram negatif) karena bakteri ini memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid rendah (1-4%) dan terdapat banyak pori-pori pada lapisan peptidoglikannya, yang membuat cairan *hand sanitizer* lebih mudah masuk kedalam sel bakteri sehingga mengganggu metabolisme dan menyebabkan kematian sel (Li et al., 2007). Sedangkan *E. coli* yang merupakan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel lebih kompleks yaitu adanya lipoprotein, lipopolisakarida, dan fosfolipid serta kandungan lipid dinding sel yang tinggi (11-12%). Adanya fosfolipid ini dapat mengurangi masuknya zat antibakteri kedalam sel (Fatisa, 2013).

Jika dibandingkan dengan aktivitas antibakteri kitosan larut air sebelum dibuat *hand sanitizer*, zona hambat *hand sanitizer* terhadap kedua bakteri tersebut cenderung menurun. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan hambat kitosan larut air menurun saat diaplikasikan menjadi *hand sanitizer*. Penurunan ini terjadi karena adanya bahan tambahan lain yang ditambahkan kedalam *hand sanitizer* seperti trietanolamin, gliserin, polisorbitat, metil paraben dan akuades. Adanya bahan-bahan pelengkap ini kemungkinan akan menghalangi masuknya kitosan larut air sebagai zat antibakteri kedalam sel bakteri sehingga daya hambat antibakterinya pun ikut menurun. Dengan demikian perlu peningkatan konsentrasi kitosan larut air ketika diaplikasikan kedalam produk *hand sanitizer*.

Begitu juga ketika dibandingkan dengan *hand sanitizer* komersial, daya hambatnya lebih rendah, produk ini menghasilkan zona hambat sebesar 15,9 mm terhadap *S. epidermidis* dan 12,5 mm terhadap *E. coli*. Tingginya zona hambat produk komersial ini kemungkinan disebabkan adanya alkohol sebagai komposisi utamanya. Dimana alkohol merupakan salah satu bahan antiseptik yang memiliki kemampuan hambat yang besar terhadap berbagai bakteri (Jones, 2000). Dari hasil regresi (data tidak ditunjukkan) *hand sanitizer* kitosan larut air perlu ditingkatkan konsentrasinya hingga 150,7 mg/ml agar memiliki daya hambat yang sama dengan *hand sanitizer* produk komersial terhadap *S. epidermidis* dan 197,7 mg/ml terhadap *Escherichia coli*.

**Uji MIC dan MBC Hand Sanitizer Kitosan Larut Air terhadap S. epidermidis dan E. coli**

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar (sumuran) berdasarkan regresi linier (Bloomfield, 1991). Nilai MIC dan MBC *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap pertumbuhan *S. epidermidis* dan *E. coli* metode Bloomfield (1991) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai MIC dan MBC *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. epidermidis* dan *E. coli*.

Jenis Bakteri	Persamaan Linear	Total Rata-rata Zona Hambat (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>S. epidermidis</i>	$y = 35,95x - 2,268$	10,39	0,270	1,065
<i>E. coli</i>	$y = 14,96x - 0,711$	6,74	0,262	1,048

Pada Tabel 4, dapat dilihat bahwa nilai MIC dan MBC *hand sanitizer* terhadap *S. epidermidis* dan *E. coli* tidak jauh berbeda. Pada Tabel diatas terlihat bahwa nilai

MIC dan MBC *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. epidermidis* lebih rendah (0,27 mg/ml dan 1,065 mg/ml) daripada nilai MIC dan MBC terhadap *E. coli* (0,26 mg/ml dan 1,048 mg/ml). Hal ini bukan berarti bakteri *E. coli* lebih rentan daripada *S. epidermidis*, karena dengan nilai MIC 0,27 mg/ml, artinya dengan konsentrasi 0,27 mg/ml *hand sanitizer* dapat menghambat pertumbuhan *S. epidermidis* sebesar 10,39 mm dalam waktu 6 jam inkubasi. Sedangkan *hand sanitizer* dengan MIC 0,262 mg/ml, artinya dengan konsentrasi 0,26 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 6,74 mm dalam waktu 6 jam inkubasi.

*Hand sanitizer* kitosan larut air memiliki nilai MIC dan MBC tidak jauh berbeda dengan *hand sanitizer* minyak daun *mint* dengan nilai MIC sebesar 0,3 mg/ml terhadap *S. epidermidis* dan *E. coli*. Nilai MBC sebesar 0,31 mg/ml terhadap *S. epidermidis* dan *E. coli* (Chamsai et al., 2009). Jika dibandingkan secara keseluruhan, *hand sanitizer* kitosan larut air memiliki kemampuan menghambat bakteri (bakteriostatik) lebih baik dibandingkan *hand sanitizer* minyak daun *mint*. Namun *hand sanitizer* minyak daun *mint* memiliki kemampuan membunuh bakteri (bakterisidal) lebih baik dibandingkan *hand sanitizer* kitosan larut air.

#### Uji Iritasi In Vivo Hand sanitizer

Uji iritasi (eritema dan edema) *hand sanitizer* kitosan larut air secara *in vivo* pada kulit tikus wistar dan perhitungan indeks iritasi primer dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji iritasi (eritema dan edema) *hand sanitizer* kitosan larut air.

Sampel Uji	Perlakuan						Indeks Iritasi Primer
	24 Jam		48 Jam		72 Jam		
	Eritema	Edema	Eritema	Edema	Eritema	Edema	
Kontrol (+)	0	0	0	0	0	0	0
F0	0	0	0	0	0	0	0
F1	0	0	0	0	0	0	0
F2	0	0	0	0	0	0	0
F3	0	0	0	0	0	0	0
F4	0	0	0	0	0	0	0
Primary Irritation Index (PII)							0

#### Keterangan:

- Kontrol (+) = Produk komersial  
 F0 = *Hand sanitizer* formula 0 (0 mg/ml)  
 F1 = *Hand sanitizer* formula 1 (110 mg/ml)  
 F2 = *Hand sanitizer* formula 2 (120 mg/ml)  
 F3 = *Hand sanitizer* formula 3 (130 mg/ml)  
 F4 = *Hand sanitizer* formula 4 (140 mg/ml)

Pada Tabel 5. pengamatan sampai 72 jam setelah diberikan *hand sanitizer* pada kulit punggung tikus memberikan skor eritema dan edema 0. Artinya *hand sanitizer* kitosan larut air pada semua formulasi yaitu F0, F1, F2, F3, dan F4 tidak melepaskan bahan-bahan kimia yang menyebabkan iritasi terhadap kulit punggung tikus yang berarti produk aman. Hal ini didukung Kuncari et al. (2015) bahwa semakin kecil nilai Indeks iritasi pada kulit, maka semakin baik pula sediaan produk yang diujikan. Nilai Indeks iritasi dibawah 0,4 dapat dikatakan sediaan suatu produk aman.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Kitosan larut air terbaik dihasilkan dari konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13% dan suhu pemanasan 40°C menghasilkan DD sebesar 94,21%; kelarutan sebesar 94%; kadar air sebesar 10,6% dan rendemen sebesar 3,5%. Konsentrasi kitosan larut air yang menghasilkan diameter zona hambat tertinggi pada bakteri *E. coli* dan *S. epidermidis* adalah 120 mg/mL sebesar 19,53 mm yang tergolong kuat dan 21,13 mm yang tergolong sangat kuat. Nilai MIC kitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* sebesar 0,28 mg/ml dan bakteri *S. epidermidis* sebesar 0,27 mg/ml. Nilai MBC kitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* sebesar 1,12 mg/ml dan bakteri *S. epidermidis* sebesar 1,08 mg/ml.

Formula *hand sanitizer* terbaik yaitu dengan penambahan kitosan larut air sebesar 130 mg/ml menghasilkan zona hambat sebesar 14,05 mm terhadap *S. epidermidis* dan sebesar 9,38 mm terhadap *E. coli*. *S. epidermidis* lebih rentan terhadap *hand sanitizer* kitosan larut air yaitu dengan nilai MIC sebesar 0,27 mg/ml dan MBC sebesar 1,065 mg/ml sudah mampu menghambat ataupun membunuh bakteri dalam waktu 6 jam inkubasi. Formula *hand sanitizer* kitosan larut air pada semua konsentrasi (110, 120, 130, dan 140 mg/ml) tidak menimbulkan iritasi ketika diaplikasikan pada kulit punggung tikus sampai dengan 72 jam.

### Saran

Pada penelitian ini telah diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi *hand sanitizer* kitosan larut air menghasilkan zona hambat yang semakin besar pula. Oleh karena itu, disarankan untuk dilakukan penelitian lebih mendalam mengenai uji aktivitas antibakteri *hand sanitizer* kitosan larut air dengan meningkatkan konsentrasinya dan diujikan terhadap bakteri yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adrianna, M., S. Elvira & V. Setijawati. 2001. Adsorpsi Cr(VI) dengan adsorben kitosan. *Jurnal Kimia Lingkungan*. 3 (1): 107-117
- Apriani, L., G.M. Iskandar & M. Said. 2012. Pengaruh variasi konsentrasi NaOH terhadap nilai derajat deasetilasi pada pembuatan kitosan dari cangkang kulit kepiting. *Jurnal Teknik Kimia*. 1 (18): 35-40
- Azwar & Agoes. 2010. *Tanaman Obat Indonesia*. Salemba Medik. Jakarta
- Bahri, S., E.A. Rahim & S. Syarifuddin. Derajat deasetilaso kitosan dari cangkang kerang darah dengan penambahan NaOH secara bertahap. *Jurnal Riset Kimia*. 1 (1): 34-39
- Basmal, J., A. Prasetyo., & Y.N. Fawzya. 2007. Pengaruh konsentrasi asam monokloroasetat dalam proses karboksimetilasi kitosan terhadap karboksimetil kitosan yang dihasilkan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 11 (8): 47-56
- Bloomfield, S.F. 1991. *Methods for Assessing Antimicrobial Activity*. In: Denyer, S. P., Hugo, W. B. (ed). *Mechanism of Action of Chemical Biocides Their Study and Xploitation*. Blackwell Scientific



- Publication. London. 4 (2): 102-106
- Chamsai, P., G. Tapnarong., D. Junlapak & N. Matan. 2009. Development of hand sanitasing spray using peppernint oil. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 3 (1): 178-183
- Chotiah, S. Potensi bakteriosin untuk kesehatan hewan dan keamanan bahan pangan. *Wartazoa*. 23 (2): 94-101
- Dompeipen, E.J., K. Marni & P.D. Riardi. 2016. Isolasi kitin dan kitosan limbah kulit udang. *Jurnal Kementerian Perindustrian*. 12 (01): 32-38
- Du, Y., Z. Yuqiao., D. Shuchao & Y. Bao. 2002. Preparation of water soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food and Emerging Technologies*. 10 (1): 103-107
- Fatisa, Y. 2013. Daya antibakteri ekstrak kulit dan biji buah pulasan (*Nephelium mutabile*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Jurnal Peternakan*. 10 (1): 44-50
- Helander, I., L. Nurmiaho., R. Ahvenainen., J. Rhoades & S. Roller. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gramnegative bacteria. *International Journal Food Microbiol*. 71 (22): 235-244
- Islam, M., S. Masum., K.R. Mahbud & Z. Haque. 2011. Antibacterial activity of crab - chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli*. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2 (4): 53-66
- Jawetz, E., J.L. Melnick & E.A. Adelberg. 2001. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 21-88
- Jones, P. 2002. Alcohol Addiction: A Psychobiological Approach, Psychiatry, and Wellness Behavioral Medicine Accociate. New York Press. 135pp
- Knorr, D. 1982. Functional properties chitin and chitosan. *Journal of Food Science*. 6 (47): 593-595
- Kuncari, E.S., Iskandarsyah & Praptiwi. 2015. Uji iritasi dan aktivitas pertumbuhan rambut tikus putih: Efek sediaan gel apigenin dan perasan herba seledri (*Apirum graveolens L.*). *Media Letbankes*. 25 (1): 15-22
- Kurniasih, M., K. Dwi & Riyanti. Optimasi kondisi adsorpsi kolestrol menggunakan karboksimetil kitosan. *Molekul*. 11 (1): 112-124
- Kusumawati, N. 2000. Peranan bakteri asam laktat. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*. 1 (1): 15-22
- Li, Y., X.G. Chen., N. Liu., C.S. Liu., C.G. Liu & X.H. Meng. 2007. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers*. 67: 227-232
- Liu, X.F., L.G. Yun., Z.Y. Dong & D.Y. Kang. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journl of Applied Polymer Science*. 79 (23): 1324-1335
- Liu, Y., K. Hu & B. Zhao. 2004. Study of depolymerization behavoir of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydrate Polymers*. 5 (7): 31-37
- Makuuchi, K. 2008. Comparative Analysis of Hydrogel and Oligo-Chitosan. EB System Comporation. Japan. 1-6pp
- Marganov. 2003. Potensi Limbah Udang Sebagai Penyerap Logam Berat (Timbal, Kadmium, Tembaga) di Perairan. IPB Press. Bogor.
- Nadarajah, K. 2005. Development and characterization of antimicrobial edible film from crawfish chitosan. Dessertation in Department of Food Science. University of Paradeniya. Paradeniya. 15 (2): 22-26
- Nandes, M. 2011. Kemampuan kitosan limbah cangkang udang sebagai resin pengikat logam tembaga (Cu). SKRIPSI. Jurusan Teknik Lingkungan. Fakultas Teknik Universitas Andalas. Padang. 1-99
- Oh, H., Y. Kim Y., E. Chang E & J. Kim. 2001. Antimicrobial characteristics of chitosans against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65 (11): 2378-2383
- Park, P.J., J.Y. Je., H.G. Byun., S.H. Moon & S.K. Kim. 2004. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal Microbiol Biotechnol*. 14 (2): 317-323
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1. Terjemahan. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Pelczar, M.J. & E.C.S. Chan. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, Penerjemah; Jakarta: UI Pr. Terjemahan dari: Elements Of Microbiology
- Purbowati, P. 2016. Upaya Peningkatan Derajat Deasetilasi pada Kitosa Cangkang Kerang Kampak (*Atrina pectinata*) melalui Proses Deasetilasi Kitin secara Bertahap. SKRIPSI. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Unversitas Airlangga. Surabaya : 1-49
- Purwantoro, R.S., N.S. Hartutiningsih., Sudarmono & Praptiwi. 2010. Uji antibakteri *lasianthus (rubiaceae)* sebagai tumbuhan berkhasiat obat dan upaya perbanyakannya. *Buletin Kebun Raya*. 13 (2): 123-12
- Rochima, E. 2007. Karakteristik kitin dan kitosan asal limbah rajungan Cirebon, Jawa Barat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 10 (1): 23-28
- Safitri, A, S. 2016. Aktivitas antibakteri kitosan berbasis cangkang lobster terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. SKRIPSI. Departemen Teknologi Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 1-4
- Saleh, M.R., Abdillah., E. Suerman., J. Basmal & N. Indriati. 1994. Pengaruh suhu, waktu dan konsentrasi pelarut pada ekstraksi kitosan dari limbah pengolahan udang beku terhadap beberapa parameter mutu kitosan. *Jurnal Pasca Panen Perikanan*. 81 (15): 30-43
- Savant., D. Vivek & J.A, Torres. 2000. Chitosan based coagulating agents for treatment of cheddar chees whey. *Biotechnology Progress*. 16 (1): 24-28
- Setiawan, D. 2006. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, jilid 4. Puspa swara. Jakarta. 1-79
- Sugita. 2009. Kitosan : Sumber Biomaterial Masa Depan. IPB Press. Bogor. 15-21

- Tanasale, M., I. Telussa., S.J. Sakewael & L. Kakerissa. 2016. Extraction and characterizaion of chitosan from windu shrimp shell (*Panaeus monodon*) and depolymerization chitosan process with hydrogen peroxide based on heating temperature variations. Indonesian Journal Chemistry. 3 (2): 306-318.
- Tiyaboonchai, R. 2003. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. Naresuan University Journal. 3 (11): 51-66
- Tsai, G.J., Z.Y. Wu & W.H. Su. 2000. Antibacterial activity of chitoolligosaccharide mixture prepered by colluse digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. Journal Food Protection. 13 (63): 747-752
- Wei, C.C., S.L. Hii & C.L. W. 2011. Antibacterial activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh and *Padina australis* Hauck (Phaeophyceae). African Journal of Biotechnology. 10 (64): 101-110
- Yudihapsari, E. 2009. Kajian kadar protein, pH, viskositas dan rendemen kecap dari berbagai tingkat penggunaan tepung kedelai. SKRIPSI. Program Studi Teknologi Hasil Ternak. Fakultas peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. 1-95
- Zahiruddin, W., A. Ariesta & E. Salamah. 2008. Karakterisasi mutu dan kelarutan kitosan dari ampas silase kepala udang windu (*Panaeus monodon*). Jurnal Buletin Teknologi Hasil Perikanan. 11 (2): 56-59