

Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Scaffold Membran Cangkang Telur yang Diaktivasi Karbonat Apatit

Mirantini Aprilisna*, Bambang Sunendar**, Haris Budi Widodo*, dan Catur Aditya*

*Kedokteran Gigi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia

**Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat, Indonesia

Jl. Dr. Soeparno, Kampus Karangwangkal Gedung E, Purwokerto, Jawa Tengah, Indonesia; e-mail: aprilisna92@gmail.com

ABSTRAK

Struktur tulang yang hilang akibat penyakit periodontal dan trauma dapat ditanggulangi dengan pemasangan *graft*. Pemasangan *graft* rentan akan adanya invasi bakteri sehingga alternatifnya dibuat *scaffold* dengan aktivitas antibakteri. Teknik jaringan berupa pembuatan *scaffold* harus memiliki sifat biokompatibel, biodegradasi, dan bioaktif. Penelitian ini menggunakan membran cangkang telur, larutan alginat dan kitosan, karbonat apatit dan larutan SBF Kokubo. Penelitian ini bertujuan mengetahui karakteristik dan aktivitas antibakteri *scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratoris dengan jumlah kelompok sampel sebanyak lima kelompok, yaitu sampel A membran cangkang telur, sampel B membran cangkang telur + karbonat apatit, sampel C membran cangkang telur + karbonat apatit + SBF selama 7 hari, sampel D membran cangkang telur + karbonat apatit + SBF selama 14 hari, dan sampel E membran cangkang telur + karbonat apatit + SBF selama 21 hari. Uji sampel yaitu karakterisasi menggunakan ATR FTIR dan SEM, serta uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Hasil karakterisasi SEM menunjukkan pori-pori serat 10-20µm pada semua sampel, ATR FTIR sampel B, C, D, E menunjukkan peningkatan gugus apatit dibanding sampel A. Pengujian antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan zona bening pada setiap sampel. Perhitungan jumlah koloni setiap sampel yaitu terbanyak koloninya sampel A ±78x10⁵ CFU/ml, dan paling sedikit koloninya sampel B ±14x10⁵ CFU/ml. Kesimpulan penelitian ini yaitu karakteristik dan aktivitas antibakteri *scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit mengandung bahan bioaktif, bersifat biodegradasi dan menunjukkan aktivitas antibakteri.

Maj Ked Gi Ind. Juni 2015; 1(1): hal 59-67

Kata Kunci: Membran cangkang telur, karbonat apatit, karakterisasi, antibakteri, *scaffold*

ABSTRACT: Characteristic And Antibacterial Activity Of Egg-Shell Membrane Scaffold Activated By Carbonate Apatite. The loss of bone structure that can be caused by periodontal disease and trauma can be treated by installation of graft. The installation of graft is vulnerable to bacterial invasion, so that the alternative is to make a scaffold with antibacterial activity. Scaffold manufacturing in engineering system must have biocompatible, biodegradable, and bioactive properties. This research used egg-shell membrane (ESM) as scaffold template, alginate, chitosan, carbonate apatite, and SBF solution. The purpose of this research is to know the characteristics, and antibacterial activity of eggshell membrane scaffold which is activated by carbonate apatite. This research used laboratory experimental method by dividing the samples into five groups that were ESM as sample A, ESM with carbonate apatite as sample B, ESM with carbonate apatite soaked in SBF sol for 7days as sample C, ESM with carbonate apatite soaked in SBF sol for 14 days as sample D, and ESM with carbonate apatite soaked in SBF sol for 21days as sample E. Then the testing on each sample was conducted: the test for characteristics used ATR FTIR and SEM, while the antibacterial activity test used diffusion method. The results of SEM characterization from all samples show that the size of pores is 10-20µm. ATR FTIR results of sample B, C, D and E show an increase in functional groups of apatite compared to sample A. Antibacterial testing on *Staphylococcus aureus* shows inhibition zone. Based on the calculation of colony number the highest number is sample A (±78x10⁵ CFU/ml), and the least is sample E ±14x10⁵ CFU/ml. The conclusion of this research is that the characteristic and antibacterial activity test of egg-shell membrane scaffold activated by carbonate apatite have bioactive and biodegradable material, and show antibacterial activities.

Maj Ked Gi Ind. Juni 2015; 1(1): hal 59-67

Keywords: Egg-shell membrane, carbonate apatite, characterization, antibacterial, scaffold

PENDAHULUAN

Tulang alveolar merupakan bagian tulang yang memiliki peranan sebagai penyokong gigi. Kerusakan jaringan tulang pembentuk dan penyokong gigi dapat menyebabkan hilangnya kepadatan

struktur tulang.¹ Struktur tulang yang hilang akibat trauma dan tidak ditanggulangi memungkinkan terjadi invasi bakteri. Bakteri pada tulang rahang yang sering ditemukan setelah mengalami trauma atau operasi yaitu *Fusobacterium nucleatum*,

Parvimonas micra, dan *Staphylococcus aureus*.² Metode alternatif yang dapat digunakan adalah pembuatan *scaffold* dengan aktivitas antibakteri. Pembuatan *scaffold* harus memenuhi prinsip rekayasa jaringan yaitu dibuat dari bahan material yang memiliki sifat biokompatibel, biodegradasi, dan bioaktif.³

Bahan dasar *scaffold* yang memenuhi kriteria bahan material yang baik yaitu *egg-shell membrane* atau membran cangkang telur. Membran cangkang telur merupakan bahan alam yang memiliki sifat biokompatibel dan biodegradasi, serta struktur berpori sehingga membran kulit telur dapat diaplikasikan sebagai *template* dalam sintesis *scaffold*.⁴ *Scaffold* dengan basis membran cangkang telur ini dapat diberi bahan polimer seperti sodium alginat dan kitosan.

Polimer membran cangkang telur, alginat dan kitosan yang sudah terbentuk memerlukan material bioaktif. Pembuatan membran hidroksiapatit dapat terbentuk di atas permukaan membran cangkang telur melalui metode *self assembly* dengan cara merendam membran cangkang telur dalam sumber apatit. Membran hidroksiapatit terbentuk karena adanya ikatan kimia (*chemisorpsi*) yang kuat antara *functional group* dari membran cangkang telur dan sumber apatit.⁵

Material bioaktif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu karbonat apatit. Karbonat apatit merupakan material bioaktif hasil substitusi ion karbonat dengan gugus fosfat dari hidroksiapatit.⁶ Hidroksiapatit memiliki ion hidroksida (OH⁻) yang merupakan radikal bebas dan kaya oksidan. Sifatnya reaktif dan bereaksi dengan beberapa biomolekul serta berefek letal pada bakteri.⁷

Scaffold yang disintesis diuji secara *in vitro* dalam larutan *Simulated Body Fluid* (SBF) Kokubo. Larutan SBF Kokubo memiliki kandungan ion yang hampir mendekati ion plasma darah manusia, yaitu Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻, dan SO₄²⁻ karena kemiripannya larutan ini dapat digunakan sebagai larutan simulasi sebelum *scaffold* dimasukkan ke dalam tubuh manusia.⁸ Perubahan fisik yang diamati adalah luruhnya material karena adanya interaksi dengan lingkungan. Menurut hasil

pengamatan, proses peleburan material dilihat sedikit demi sedikit melalui permukaan material.⁹

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti tertarik untuk mengetahui karakteristik dan aktivitas antibakteri *scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit sehingga didapatkan *scaffold* dengan karakteristik bioaktif, biodegradasi dan memiliki aktivitas antibakteri.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di *Advanced Material Processing Laboratory*, FMIPA-ITB, dan *Sekolah Farmasi ITB*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan sumber data diambil langsung selama proses penelitian di laboratorium. Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok A (*scaffold* membran cangkang telur sebagai kontrol), kelompok B (*scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit), kelompok C (*scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit yang direndam dalam larutan SBF selama 7 hari), kelompok D (*scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit yang direndam dalam larutan SBF selama 14 hari), dan kelompok E (*scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit yang direndam dalam larutan SBF selama 21 hari). Jumlah sampel pada masing-masing kelompok adalah 4 buah. Setiap sampel diuji dan hasil dideskripsikan untuk mengetahui bagaimana karakteristik dan aktivitas antibakteri dari membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit untuk aplikasi material *scaffold* hasil sintesis.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia 250 dan 500 ml, gelas ukur 25 dan 50 ml, pipet tetes, cawan petri, pinset plastik, spatula, *magnetic stirrer*, timbangan digital, pot zalp, dan indikator pH.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah membran cangkang telur, sodium hidroksida, asam nitrat 25%, sodium alginat, *chitosan highly viscosity*, *calcium nitrat tetrahydrate*, *amonium hydrogen fosfat*, *calcium carbonate precipitate*, larutan SBF Kokubo, aqua dm, dan *aqua bidest*.

Cara pembuatan *scaffold* diawali dengan preparasi membran cangkang telur. Preparasi membran cangkang telur diawali dengan pelepasan membran cangkang telur bagian dalam dengan cara manual. Setelah itu pelepasan lapisan membran cangkang telur bagian luar menggunakan larutan HNO_3 1 M, dan terakhir perendaman membran cangkang telur bagian luar atau *outer membrane* dalam NaOH 0,1 M selama 24 jam.

Langkah berikutnya pembuatan larutan alginat-kitosan, karbonat apatit dan larutan SBF Kokubo. Pertama pembuatan larutan alginat dan kitosan, yaitu larutan alginat 0,1% dan larutan kitosan 0,15%, kemudian membran direndam ke dalam larutan alginat dan kitosan secara bergantian selama 1 jam. Kedua pembuatan larutan karbonat apatit. Pembuatan larutan karbonat apatit menggunakan prekursor berupa larutan *calcium nitrat tetrahydrate*, *amonium hydrogen phosfat* dan *sodium hydrogen carbonate* yang dilarutkan ke dalam aqua dm. Membran cangkang telur yang sudah direndam dalam larutan alginat-kitosan langsung dimasukkan ke dalam larutan karbonat apatit selama 24 jam. Ketiga pembuatan larutan SBF Kokubo. Pembuatan larutan SBF Kokubo dibuat 1,5x SBF yang membutuhkan NaCl , NaHCO_3 , KCl , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , Na_2SO_4 ke dalam 1000 ml aquabides secara berurutan dan diberi buffer tris-hydroxymethyl animomethane

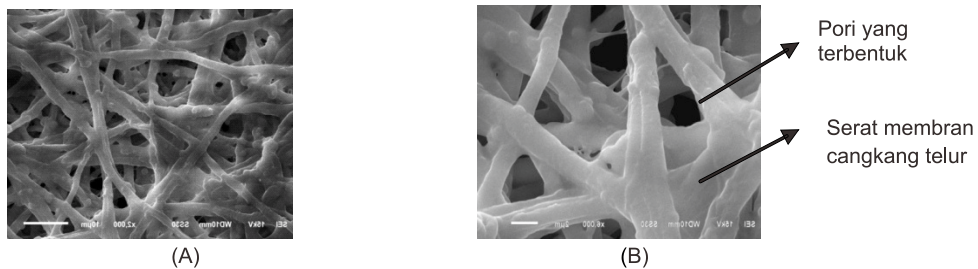
$[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2]$ dan HCl . Kemudian membran direndam selama 7, 14 dan 21 hari dengan mengganti larutan SBF setiap 3 hari sekali.

Langkah terakhir berupa pengujian sampel yaitu uji karakterisasi *Scanning Electron Microscope* (SEM), karakterisasi *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared* (ATR FTIR), dan uji aktivitas bakteri. Pertama, karakterisasi SEM digunakan untuk melihat topografi permukaan dari suatu material. Sampel A, B, C, D, dan E dilakukan uji SEM untuk mengetahui struktur pori dan senyawa yang terdapat pada membran *scaffold*. Kedua, karakterisasi ATR FTIR bertujuan mengidentifikasi dan menentukan struktur material organik dan anorganik. Sampel A, B, C, D, dan E dilakukan uji ATR FTIR untuk mengetahui gugus fungsi senyawa yang terdapat pada membran *scaffold*. Ketiga metode yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri yaitu diawali dengan metode difusi agar bertujuan mengukur zona bening/zona hambat, dan kedua perhitungan koloni untuk melihat jumlah koloni yang tumbuh. Sampel A, B, C, D, dan E diukur beratnya masing-masing ± 10 mg. Bakteri yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus*.

HASIL PENELITIAN

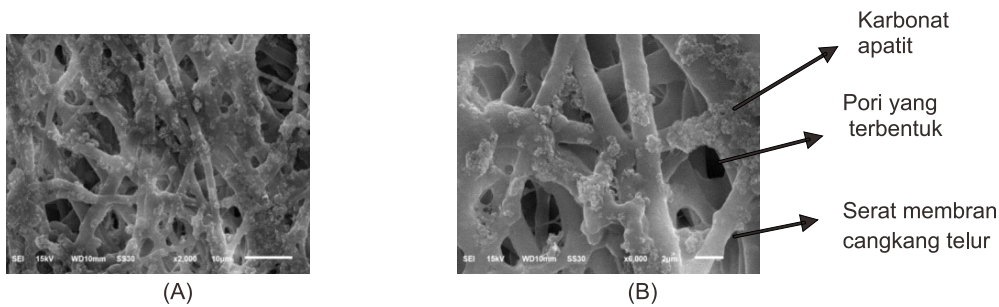
A. Hasil Karakterisasi SEM

1. Sampel A



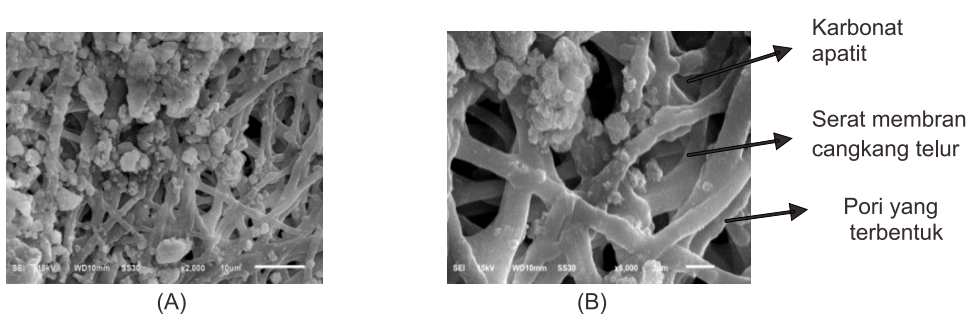
Gambar 1. Hasil karakterisasi SEM Sampel A membran cangkang telur (A) perbesaran 2000x dan (B) perbesaran 6000x. Hasil menunjukkan pori-pori membran berukuran 10-20 μm dan serat membran 2 μm .

2. Sampel B



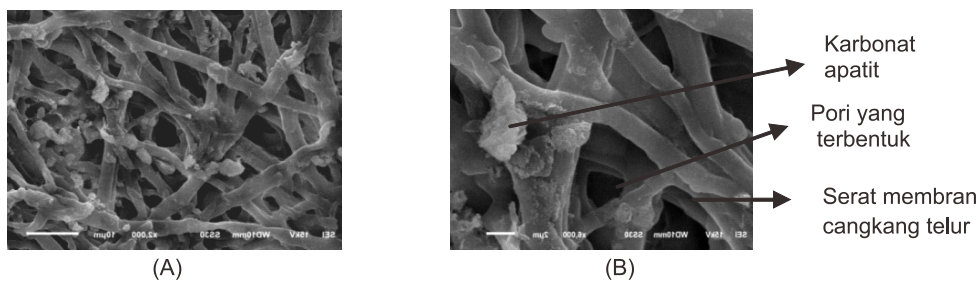
Gambar 2. Hasil karakterisasi SEM Sampel B membran cangkang telur + karbonat apatit (A) perbesaran 2000x dan (B) perbesaran 6000x. Hasil menunjukkan perlekatan karbonat apatit pada serat membran.

3. Sampel C



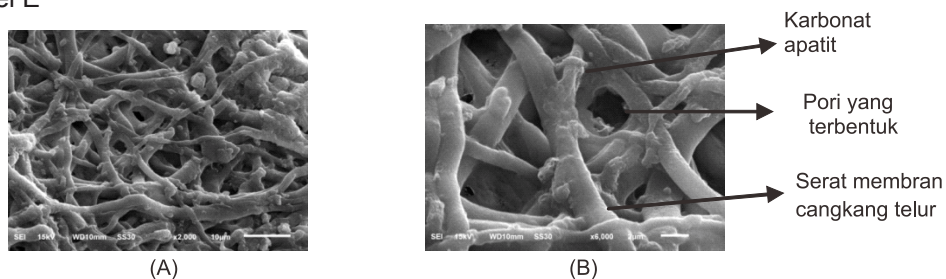
Gambar 3. Hasil karakterisasi SEM Sampel C membran cangkang telur + karbonat apatit + SBF 7 hari (A) perbesaran 2000x dan (B) perbesaran 6000x. Hasil menunjukkan perlekatan apatit pada serat lebih banyak dari Sampel B.

4. Sampel D



Gambar 4. Hasil karakterisasi SEM Sampel D membran cangkang telur + karbonat apatit + SBF 14 hari (A) perbesaran 2000x dan (B) perbesaran 6000x. Hasil menunjukkan pelepasan apatit pada permukaan serat membran.

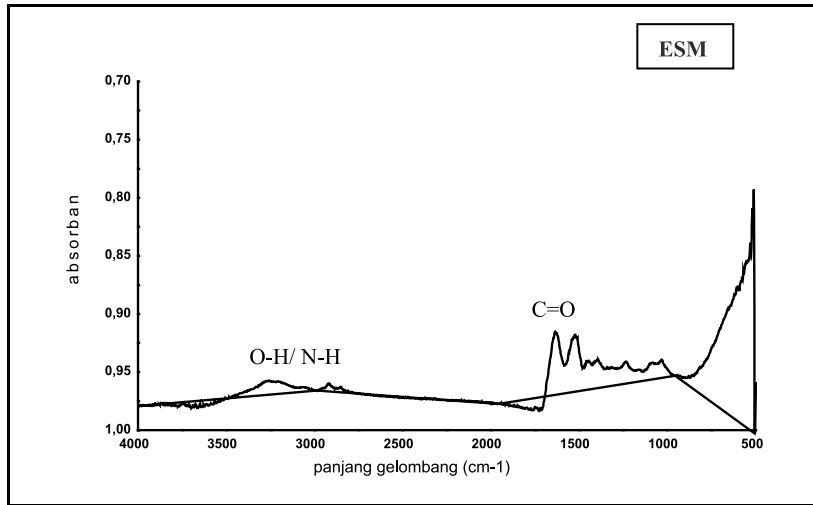
5. Sampel E



Gambar 5. Hasil karakterisasi SEM Sampel E membran cangkang telur + karbonat apatit + SBF 21 hari (A) perbesaran 2000x dan (B) perbesaran 6000x. Hasil menunjukkan pelepasan apatit lebih banyak dari Sampel D.

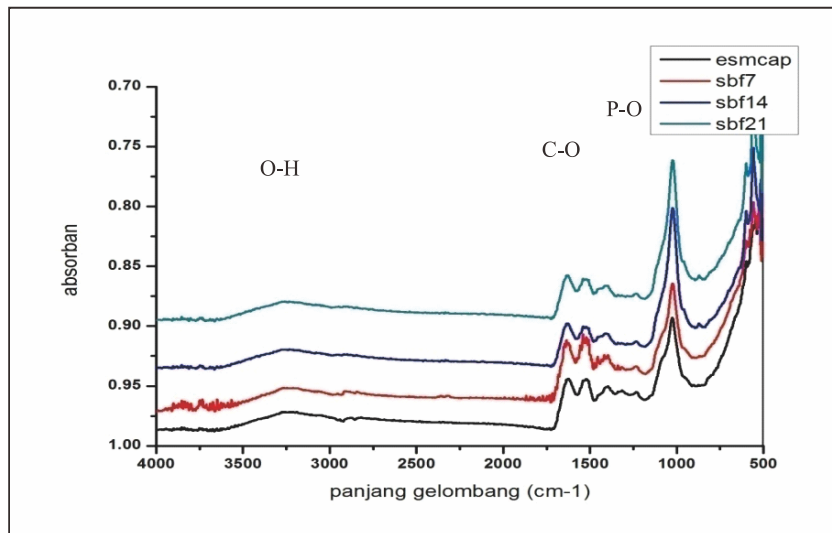
B. Hasil Karakterisasi ATR FTIR

1. Sampel A



Gambar 6. Grafik ATR FTIR Sampel A membran cangkang telur

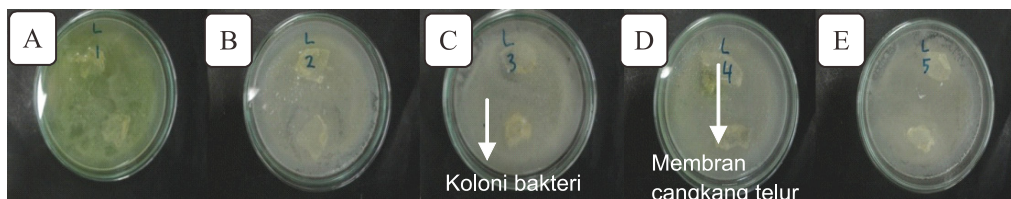
2. Sampel B, C, D, E



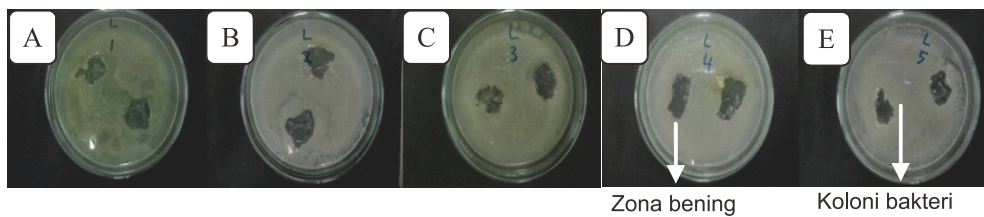
Gambar 7. Perbandingan grafik ATR FTIR sampel B, C, D dan E

C. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

1. Tahap 1 Metode Difusi

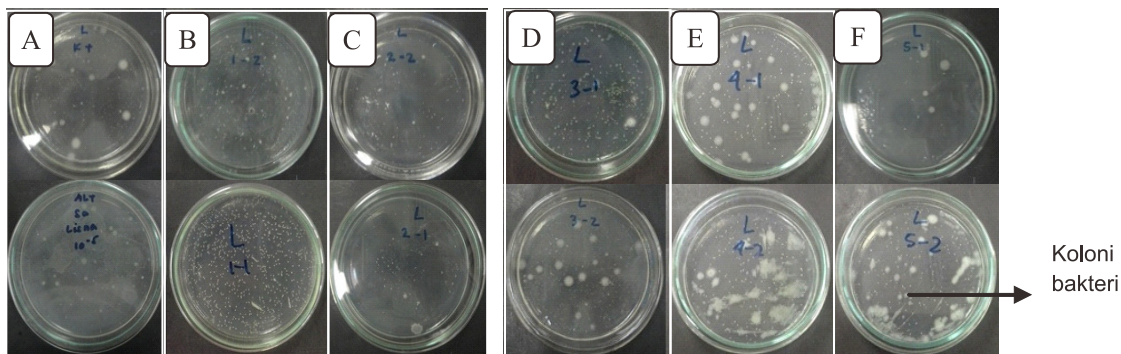


Gambar 8. Scaffold sebelum dilepas terhadap bakteri *S.aureus*
A) sampel A, B) sampel B, C) sampel C, D) sampel D, E) sampel E



Gambar 9. Scaffold setelah dilepas terhadap bakteri *S.aureus* A) sampel A, B) sampel B, C) sampel C, D) sampel D, E) sampel E

2. Tahap 2 Perhitungan Koloni



Gambar 10. Hasil uji aktivitas antibakteri tahap 2 terhadap bakteri *S.aureus* A) kontrol, B) sampel A, C) sampel B, D) sampel C, E) sampel D, F) sampel E

3. Jumlah koloni bakteri *S. aureus*

Tabel 1. Jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *S. Aureus*

No	Kontrol	Sampel A	Sampel B	Sampel C	Sampel D	Sampel E
1		73×10^5	46×10^5	29×10^5	19×10^5	13×10^5
2	138×10^5	83×10^5	58×10^5	39×10^5	18×10^5	16×10^5

PEMBAHASAN

A. Analisa Karakterisasi SEM dan ATR FTIR

Hasil SEM menunjukkan ukuran serat membran pada sampel A, B, C, D dan E berkisar antara 2 μm dilihat dengan perbesaran 6000x dan pori-pori serat membran berkisar 10-20 μm dengan perbesaran 2000x. Pori-pori yang terbentuk cukup untuk pertumbuhan osteoblas yaitu 20-30 μm . Penggunaan larutan NaOH 0,1 M selama 24 jam dapat mengaktifkan permukaan membran sehingga pembentukan apatit lebih banyak diatas permukaan dan pori-pori membran lebih terbuka. NaOH dapat menetralkan sisa-sisa asam pada membran dan berfungsi menghilangkan *non-collagenous protein* dalam membran cangkang telur.⁵

Membran cangkang telur terlebih dahulu direndam dalam larutan kitosan dan alginat. Kitosan sebagai pendispersi akan mempercepat pertumbuhan apatit pada permukaan membran. Kitosan juga memiliki banyak gugus amino yang memudahkan gugus OH⁻ mudah berikatan. Gugus OH⁻ banyak ditemukan pada alginat. Selain menambah fleksibilitas membran, perendaman membran pada alginat dapat meningkatkan gugus OH⁻ pada permukaan membran. Semakin banyak gugus OH⁻ maka ikatan senyawa aktif Ca²⁺ dan PO₄³⁻ semakin banyak.⁵

Senyawa aktif yang digunakan berupa karbonat apatit. Karbonat apatit mengandung gugus Ca²⁺, PO₄³⁻, OH⁻ dan CO₃²⁻ yang berikatan secara kimia. Hasil ATR FTIR pada Gambar 7

menunjukkan peningkatan gugus fungsi P-O yaitu PO_4^{3-} , dan C-O yaitu CO_3^- setelah perendaman *scaffold* dalam larutan karbonat apatit. Hal ini membuktikan *scaffold* yang disintesis memiliki sifat bioaktif karena mengandung senyawa karbonat (CO_3^-) dan posfat (PO_4^{3-}). Penambahan karbonat apatit akan mempengaruhi interkoneksi dari *scaffold*. Hal ini sesuai dengan hasil karakterisasi SEM pada sampel B berupa perlekatan apatit pada permukaan membran cangkang telur (Gambar 2).¹⁰

Perendaman selanjutnya yaitu menggunakan larutan SBF. Larutan SBF tidak hanya mengandung garam melainkan juga hidroksiapatit. Hidroksiapatit akan meningkat seiring pergantian larutan SBF setiap tiga kali sehari. Pembentukan hidroksiapatit semakin banyak dengan semakin lamanya waktu perendaman dalam larutan SBF Kokubo sebagai sumber hidroksiapatit. Hal ini terbukti dengan adanya penumpukan apatit pada sampel C lebih banyak dibanding sampel B dilihat dari Gambar 3 dengan perbesaran 2000x. Sampel C berupa membran cangkang telur-karbonat apatit yang direndam dalam larutan SBF selama 7 hari. Hal ini sejalan dengan proses *biomimetic* tulang terjadi pada hari ke 7 sampai 14. *Biomimetic* apatit menunjukkan diferensiasi sel-sel stroma sumsum tulang sepanjang garis *osteogenic*.¹¹

Penurunan apatit pada permukaan serat membran sampel D dilihat pada Gambar 4. Hal ini terjadi karena degradasi dari polimer alginat dan kitosan, sehingga apatit yang menempel pada serat lepas dari permukaan serat membran cangkang telur. Apatit yang lepas pada permukaan terperangkap dalam pori-pori membran terlihat pada perbesaran 6000x. Sama halnya pada sampel E dilihat pada Gambar 5 yang menunjukkan penurunan jumlah apatit pada permukaan membran lebih banyak dibanding sampel D. Hal ini membuktikan bahwa polimer pada *scaffold* memiliki sifat degradasi.

Apatit mulai terbentuk pada membran yang direndam dalam larutan SBF Kokubo selama 6 hari. Semakin lama perendaman maka diameter serat akan semakin menebal. Perbedaan terjadi setelah membran direndam selama 12 hari. Perendaman

menunjukkan penurunan serat membran. Hal ini disebabkan karena sifat biodegradasi dari serat membran yang mengandung senyawa kitosan.⁵

Kitosan dengan persentasi tinggi dapat mempercepat proses biodegradasi. Penelitian Ardhananeswari (2013), menunjukkan besaran pori-pori *scaffold* dengan metode *freeze-drying* yaitu 60% kitosan menghasilkan pori-pori sebesar 50 μm , 70% kitosan menghasilkan 100 μm dan 80% kitosan menghasilkan 200 μm .¹²

B. Analisa Uji Aktivitas Antibakteri

Berdasarkan hasil pengujian sampel A, B, C, D, dan E melalui tahap 1 berupa metode difusi agar pada Gambar 8 tidak ditemukan zona bening/zona hambat pada semua sampel terhadap *Staphylococcus aureus*. Zona bening terlihat setelah membran dilepas dilihat pada Gambar 9. Ada perbedaan zona bening pada setiap sampel, hal ini menjelaskan bahwa setiap sampel memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda. Selanjutnya diteruskan pada tahap 2 berupa metode perhitungan koloni untuk memastikan besaran aktivitas antibakteri pada setiap sampel dilihat dari jumlah koloni yang tumbuh.

Hasil pengujian sampel tahap 2 (Gambar 10) dapat dilihat pada Tabel 1 dengan hasil adanya penurunan jumlah koloni *Staphylococcus aureus* dari sampel A, B, C, D, dan E. Jumlah koloni pada kontrol sebanyak 138×10^5 CFU/ml. Penurunan koloni mulai terlihat pada sampel A dengan jumlah koloni menjadi $\pm 78 \times 10^5$ CFU/ml. Sampel A merupakan membran yang direndam dalam larutan HNO_3 dan NaOH. Kandungan NaOH pada membran menambah sifat antibakteri. Penelitian mengenai perbandingan aktivitas antibakteri minyak kelapa *virgin* menunjukkan pemberian 25% NaOH membentuk zona inhibit 9,20 mm, 50% (9,03 mm) dan 75% (10 mm) terhadap bakteri *S. Aureus*.¹³ Basis metal berupa alkalin seperti NaOH dan KOH memiliki kelarutan yang tinggi dan memiliki aktivitas antibakteri.¹⁴

Penurunan koloni menjadi $\pm 52 \times 10^6$ CFU/ml terjadi pada sampel B karena adanya apatit pada membran. Sampel B mengandung apatit (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , dan OH^-) dengan kadar pH 9-11

yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bakteri dan telah dipelajari dalam beberapa penemuan. Penelitian mengenai perbandingan aktivitas antibakteri sejumlah larutan HA terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* menunjukkan aktivitas antibakteri 200 mg larutan HA menghambat pertumbuhan *S. mutans* pada media agar *Brain Heart Infusion* (BHI).¹⁵

Seiring bertambahnya apatit yang terperangkap dalam pori-pori membran, aktivitas antibakteri semakin baik. Hal ini terlihat pada sampel C yang menunjukkan penurunan koloni dengan jumlah koloni *S. aureus* $\pm 34 \times 10^5$ CFU/ml. Jumlah koloni semakin sedikit seiring lamanya perendaman *scaffold* dalam larutan SBF yaitu $\pm 18 \times 10^5$ CFU/ml pada sampel D, dan $\pm 14 \times 10^5$ CFU/ml pada sampel E.

Kandungan hidroksiapatit yang semakin meningkat pada sampel C, D, dan E menaikkan pH membran. Sifat alkali memiliki efek menghancurkan membran sel dan struktur protein bakteri.¹⁶ Sifat alkali didapat dari tingginya konsentrasi ion hidroksil pada larutan karbonat apatit dan SBF. Ion OH⁻ berperan aktif menghambat pertumbuhan bakteri. Ion hidroksil (OH⁻) yang mengandung oksidan merupakan radikal bebas yang reaktif dan bereaksi dengan beberapa biomolekul.⁷ Mekanisme yang mungkin terjadi yaitu induksi ion hidroksil bereaksi dengan membran sel, dan komponen seperti mitokondria yang menyebabkan perubahan ireversibel dalam struktur bakteri. Hal ini mengakibatkan hilangnya aktivitas biologis enzim dan gangguan metabolisme seluler.¹⁷

KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini yaitu *scaffold* membran cangkang telur yang diaktivasi karbonat apatit mengandung bahan bioaktif, bersifat biodegradasi dan menunjukkan aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Steiner A, Yuan L, Dai S. Preparation of Well-Dispersed Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Solution with Biocompatible N-Succinyl-

O-carboxymethylchitosan. *Journal Physico Chemistry*. 2008; 112: 5432-5438.

2. Gaetti-Jardim Jr. E, Fardin AC, Gaetti-Jardim EC, de Castro AL, Schweitzer CM, Avila-Campos MJ. Microbiota Associated with Chronic Osteomyelitis of The jaw. *Journal of Microbiology*. 2010; 41:1056-1064.
3. Indrani DJ. Preparasi Nanokristalin Hidroksiapatit untuk Scaffold Rekayasa Jaringan Tulang. *Jurnal Sains Material Indonesia*. 2012; 4: 36-39.
4. Lee Seung-Mo, Grass G, Kim Gyeong-Man, Dresbach C, Zhang L, Goseleand U, Knez M. Low-temperature ZnO Anatomic Layer Deposition on Biomembrane Supports: Flexible Photocatalytic ZnO Structures from Eggshell Membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009; 11: 3608-3614.
5. Ikaningsih MA. Sintesis Membran Hidroksiapatit Menggunakan Egg-Shell Membrane sebagai Membrane Support dengan Metode Self Assembly. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Tesis. 2011.
6. Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM. Substituted Hydroxyapatites for Bone Repair, *Journal Material Science: Material Medical*. 2012; 23(10): 2335-2347.
7. Aruoma OI, Cuppett SL. Antioxidant Methodology: In Vivo and in vitro Concepts. USA: AOCS Press. 2000
8. Ohtsuki C. How to Prepare The Simulated Body Fluid (SBF) and Its Related Solutions [internet]. 2012. <http://mswebs.naist.jp/LABs/tanihara/ohtsuki/SBF/index.html>. Diakses pada tanggal 27 Juli 2014.
9. Rohaeti E. Pengaruh Variasi Berat Molekul Poli Etilen Glikol terhadap Sifat Mekanik Poliuretan. *Jurnal Matematika dan Sains*. 2009; 8: 2.
10. Tan Q, Fabrication of Poursous Scaffold with a Cintrollable Microstructure and Mechanical Propertiesby Porogen Fusion Technique. *International Journal Science*. 2011; 12: 890-904

11. Meyer U, Meyer T, Handschel J, Wiesmann HP. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009
12. Ardhananeswari D. Pengaruh Variasi Konsentrasi Kitosan terhadap Struktur Pori, Kekuatan Tekan dan Sifat Bioaktif pada Scaffold Hasil Sintesis. Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman. Skripsi. 2013.
13. Silalahi J, Yademetripermata, Putra EDL. Antibacterial Activity of Hydrolyzed Virgin Coconut Oil. *Asian Journal Pharmacy Clinic Research*. 2014; 7; 90-94.
14. Venigalla BS, Prasad KL, Singh VT, Jyotsna SV, Ghatole K. Comparison of Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide with and without Addition of Herbal Medicament against *Enterococcus Faecalis*. 2014; 27: 38-41.
15. Tin-Oo MM, Gopalakrishnan V, Samsuddin AR, Al-Salihi KA, Shamsuria O. Antibacterial Property of Locally Produced Hydroxyapatite. *Archives of Orofacial Sciences*. 2007; 2: 41-44.
16. Walton RE, Holton IF Jr., Michelich R. Calcium Hydroxide as an Intracanal Medication: Effect on Treatment Pain. *Journal Endodontic*. 2003; 29: 627-629.
17. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2004.