

PENGARUH KONSENTRASI KITOSAN TERHADAP AKTIVITAS ANTIBAKTERI DENGAN METODE DIFUSI AGAR (SUMUR)

[The Effect of Chitosan Concentrations on the Antibacterial Activity with
Gel Diffusion/Well Method]

Fibra Nurainy¹⁾, Samsul Rizal¹⁾, Yudiantoro²⁾

¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung
Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Lampung 35145
Telp. 0721-781823; e-mail: nurainy_thp@unila.ac.id

²⁾ Alumni Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung

ABSTRACT

The aim of this work was to obtain the minimal concentration of chitosan which possess antibacterial characteristic. The concentrations of chitosan that used were 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; and 0,8% (w/v), whereas bacteria cultures used to examine antibacterial activity of chitosan were *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Well method (gel diffusion) was utilized to test the chitosan antibacterial activity. The result was analyzed using descriptive method and presented in the graphic form. The result showed the activity of chitosan restraint as antibacterial. The test of chitosan antibacterial activity utilizes gel diffusion (well) method. The data analyzed descriptively and presented in the graphic form. The result showed the activity of chitosan restraint as anti bacteria against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* or *Escherichia coli* with the highest restraint diameter was noticed at the addition of 0,2% chitosan, which were 20,27 mm/mg chitosan, 24,50 mm/mg chitosan and 31,53 mg chitosan, respectively. The lowest restraint diameter was found at the addition of 0,8% chitosan, which were 6,82 mm/mg chitosan, 12,14 mm/mg chitosan and 14,23 mm/mg chitosan, respectively.

Keywords: Antibacterial activity, chitosan, gel diffusion method

PENDAHULUAN

Pangan merupakan kebutuhan pokok manusia. Tujuan utama penggunaan pangan adalah untuk memenuhi kebutuhan zat gizi makanan. Bahan pangan/makanan yang ideal adalah yang cukup kandungan energi dan zat gizinya, mempunyai daya simpan yang lebih lama, aman dalam arti tidak menyebabkan gangguan kesehatan, lebih enak, dan lebih praktis sehingga meningkatkan derajat penerimaan konsumen (Rangga, 1997). Informasi yang banyak beredar akhir-akhir ini mengenai pencemaran berbagai produk pangan oleh bahan kimia berbahaya seperti formalin dan

boraks sangat meresahkan bagi kalangan masyarakat. Hasil pengujian oleh Balai Besar POM DKI Jakarta pada November-Desember 2005 terhadap 98 sampel produk pangan yang dicurigai mengandung formalin, 56 sampel di antaranya dinyatakan positif mengandung formalin. Perinciannya, dari 23 sampel mi basah, 15 sampel di antaranya tercemar formalin (65 persen). Sebanyak 46,3 persen dari 41 sampel beragam jenis tahu positif mengandung formalin. Sebanyak 34 sampel aneka jenis ikan asin, 22 sampel di antaranya juga tercemar formalin (64,7 persen). Sampel ikan asin yang positif berformalin itu, antara lain, ikan asin sange belah, ikan cucut

daging super, dan jambal roti. (Anonim, 2005).

Penggunaan formalin sebagai pengawet bahan pangan diduga karena tingkat kesadaran produsennya akan kesehatan masyarakat masih sangat rendah, di samping mereka tidak mempunyai pengetahuan yang memadai mengenai bahaya bahan kimia terlarang tersebut. Faktor lain, formalin juga mudah dijumpai di pasar bebas dengan harga yang murah. Baik formalin maupun boraks merupakan bahan kimia yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia.

Salah satu alternatif pengganti formalin sebagai pengawet makanan adalah penggunaan kitosan yang lebih aman dan tidak berefek negatif terhadap kesehatan tubuh. Kitosan dapat berfungsi sebagai bahan pengawet karena mempunyai sifat anti bakteri (Zheng dan Zhu, 2002; No *et al.*, 2002). Diduga terdapat konsentrasi minimum kitosan sebagai antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi minimum kitosan yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang bersifat patogen dan merusak makanan.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah kitosan yang diperoleh dari PT. Vital House Indonesia dan kultur bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Lampung. Kultur bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri Gram negatif, yaitu *Escherichia coli* dan bakteri Gram positif yaitu *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. Media agar yang digunakan adalah Nutrient Agar (NA),

Vogel Johnson Agar (VJA), dan Eosin Methylene Blue Agar (EMBA). Bahan kimia yang digunakan adalah alkohol 70%, spiritus, buffer pH 4 dan pH 7.

Peralatan yang digunakan adalah Clean Bench (ruang aseptik yang dilengkapi lampu UV) merk Kotterman-Jerman, lemari inkubator, autoklaf, hotplate, cawan petri, neraca analitik, Erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volumetrik, jarum ose, gelas ukur, labu takar, lampu bunsen, dan alat-alat pembantu lainnya.

Perlakuan Penelitian

Perlakuan yang diterapkan pada bakteri uji ini adalah konsentrasi kitosan yang ditambahkan. Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 0; 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 persen (w/v). Pengujian aktivitas antibakteri kitosan menggunakan metode difusi agar (sumur; Murhadi, 2002). Percobaan dilakukan dengan 3 kali ulangan. Data hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan atau grafik kemudian dianalisis secara deskriptif.

Persiapan Kultur Bakteri Uji

Kultur bakteri uji yang akan digunakan disiapkan dengan cara mengambil satu ose bakteri dari agar miring NA, kemudian diinokulasikan ke dalam 10 ml NB steril. Selanjutnya divortek untuk meratakan bakteri di dalam NB, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam didapatkan inokulum yang langsung dapat digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri (Lukman, 1984 dalam Apriyanto 2002).

Pengujian Aktivitas Antibakteri Kitosan dengan Metode Sumur

Metode sumur (difusi agar) didasarkan pada kemampuan senyawa-senyawa antibakteri yang diuji untuk menghasilkan jari-jari zona penghambatan

di sekeliling sumur uji terhadap bakteri yang digunakan sebagai penguji. Pengujian aktivitas antibakteri kitosan dimulai dengan menyiapkan media pertumbuhan bakteri. Pembuatan media diawali dengan penimbangan media bubuk dan penambahan aquades seperti petunjuk pada kemasan. Kemudian dilakukan pengadukan sambil dipanaskan menggunakan hot magnetic stirrer hingga larutan media homogen yang ditandai oleh warna larutan yang jernih, selanjutnya Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi media didinginkan dalam keadaan tertutup pada suhu ruang sampai suhu mencapai 40°C lalu bakteri uji sebanyak 0,1% diinokulasikan kedalam masing-masing media pertumbuhan (0,1 mL kultur dalam NB ke dalam 100 mL media pertumbuhan) kemudian dihomogenkan.

Media pertumbuhan yang digunakan untuk masing-masing bakteri uji adalah (1) Nutrient Agar untuk *Bacillus subtilis*, (2) Vogel Johnson Agar untuk *Staphylococcus aureus*, dan Eosin Methylene Blue Agar untuk *Escherichia coli* (Garriga et al., 1993 dalam Apriyanto, 2002).

Media yang telah diinokulasi kultur bakteri uji tersebut dituang ke dalam cawan-cawan dan dibiarkan hingga membeku. Kemudian dibuat lima lubang (sumur) secara aseptis dengan diameter 7 mm dan dimasukkan larutan kitosan sebanyak 60 µL yang mengandung kitosan dengan konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 persen (b/v). Larutan kitosan dibuat dengan melarutkan kitosan sesuai dengan konsentrasi ke dalam larutan asam asetat 1%. Inkubasi dilakukan secara statis pada suhu 37°C selama 48 jam (Garriga et al., dalam Apriyanto 2002).

Penghitungan Zona Penghambatan

Zona penghambatan senyawa antibakteri dari kitosan diukur berdasarkan jari-jari (r_p , mm) penghambatan berupa areal bening di sekeliling sumur uji. Pengukuran jari-jari (r_p , mm) dilakukan dengan mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat menggunakan jangka sorong (ketelitian 0,05 mm) pada beberapa sisi sumur uji, lalu dirata-ratakan. Nilai diameter (d , mm) zona hambat hasil pengamatan langsung diperoleh dengan menggunakan rumus $d = 2 \times r_p$ (Murhadi, 2002). Selanjutnya untuk mendapatkan nilai diameter zona hambat hasil konversi (d') dilakukan dengan konversi perhitungan menggunakan rumus berikut (Murhadi, 2002) :

$$r' = [\sqrt{(r_p^2 + 2 \cdot r_p \cdot r_s) \times Fk + r_s^2}] - r_s$$

$$d' = 2 (r')$$

Keterangan :

r' = Jari-jari (mm) zona hambat hasil konversi.

r_p = Jari-jari (mm) zona hambat hasil pengujian langsung (pengukuran dengan jangka sorong)

r_s = Jari-jari sumur uji (mm) ditambah jari-jari zona hambat kontrol pelarut

Fk = Faktor koreksi pengenceran atau pemekatan

d' = Diameter (mm) zona hambat hasil konversi

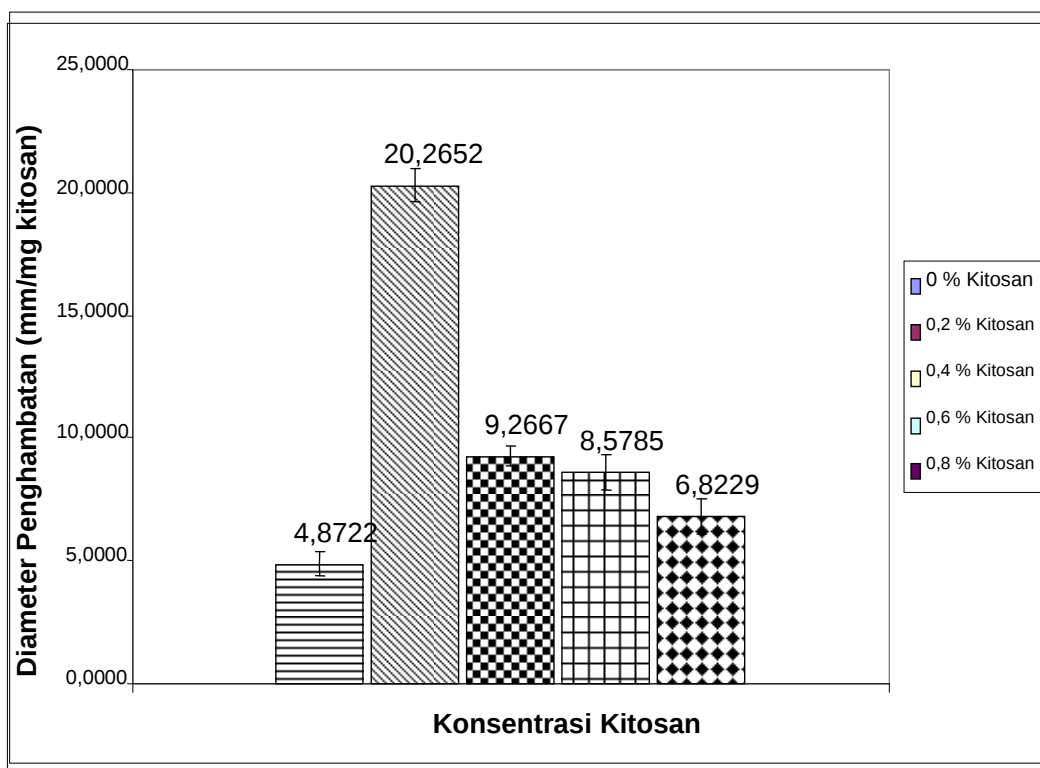
HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Anti-*Staphylococcus aureus*

Berdasarkan nilai diameter konversi (d' , mm/mg kitosan) hasil penelitian dengan menggunakan metode sumur dapat diketahui bahwa larutan kitosan menghasilkan zona penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* yang menurun

seiring peningkatan konsentrasi kitosan. Diameter penghambatan antibakteri kitosan terhadap *Staphylococcus aureus* berturut turut pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 persen

(b/v) adalah 4,87; 20,27, 9,27, 8,58, dan 6,82 mm/mg kitosan. Histogram zona penghambatan kitosan secara parsial terhadap *Staphylococcus aureus* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Histogram zona penghambatan larutan kitosan terhadap *Staphylococcus aureus*

Pada Gambar 1 terlihat bahwa larutan kitosan memberikan efek penghambatan, terhadap *Staphylococcus aureus* tetapi polanya menurun. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0% tetap terjadi penghambatan dengan diameter penghambatan sebesar 4,87 mm. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya asam asetat dalam larutan sebagai pelarut. Efek penghambatan tersebut bukan merupakan aktivitas kitosan, karena asam asetat juga memiliki kemampuan menghambat bakteri. Pada

larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,2% (b/v), terjadi penghambatan tertinggi dengan diameter penghambatan sebesar 20,27 mm/mg kitosan. Hal tersebut diduga karena kekentalan larutan kitosan masih rendah sehingga masih dapat berdifusi ke media agar tempat tumbuhnya *Staphylococcus aureus*. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,8%(b/v), terjadi penghambatan terendah. Hal tersebut diduga karena larutan kitosan 0,8%(b/v)

sudah terlalu kental sehingga tidak dapat berdifusi secara baik dalam media agar.

Staphylococcus aureus merupakan jenis bakteri Gram positif. Menurut Pelezar dan Chan (1986), struktur dinding bakteri Gram positif relatif sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri menemukan sasaran untuk bekerja. Pada kenyataannya, pengujian sifat antibakteri kitosan menggunakan metode sumur dengan peningkatan konsentrasi kitosan tidak menunjukkan sifat antibakteri kitosan terhadap *Staphylococcus aureus* yang meningkat pula. Pada pengujian dengan metode difusi agar (sumur), kitosan yang ditambahkan ke dalam sumur uji diharapkan akan berdifusi ke media tumbuh bakteri. Konsentrasi kitosan yang tinggi akan menghasilkan larutan yang kental. Larutan yang terlalu kental akan sulit melakukan difusi dibandingkan dengan larutan yang lebih encer. Akibatnya, data diameter penghambatan kitosan menunjukkan penurunan sifat penghambatan. Percobaan pendahuluan menggunakan metode kontak menunjukkan adanya sifat penghambatan antibakteri kitosan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Kitosan dapat berikatan dengan lipid yang ada pada permukaan dinding sel bakteri. *Staphylococcus aureus* merupakan jenis bakteri Gram positif. Menurut Lay dan Sugyo (1992) dalam Yusman (2006), bakteri Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tinggi dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Kandungan peptidoglikan yang tinggi akan mengakibatkan tingginya kandungan lipid. Menurut Widodo et al. (2006), kitosan bersifat polikationik dapat mengikat lipid dan logam berat. Rusaknya lipid pada dinding sel bakteri akan mengakibatkan rusaknya pertahanan sel. Bakteri Gram positif

memiliki asam teikoat, polimer yang bersifat asam yang mengandung ribitol, fosfat, atau gliserol fosfat. Menurut Yusman (2006), asam teikoat yang bersifat asam dan mengandung ulangan rantai gliserol fosfat dan ribitol fosfat pada bakteri Gram Positif menyebabkan bakteri Gram positif bermuatan negatif. Muatan negatif pada dinding sel bakteri akan berikatan dengan muatan positif dari kitosan membentuk senyawa yang tidak bermuatan. Selain asam teikoat akan berikatan dengan kitosan yang bersifat bersifat basa.

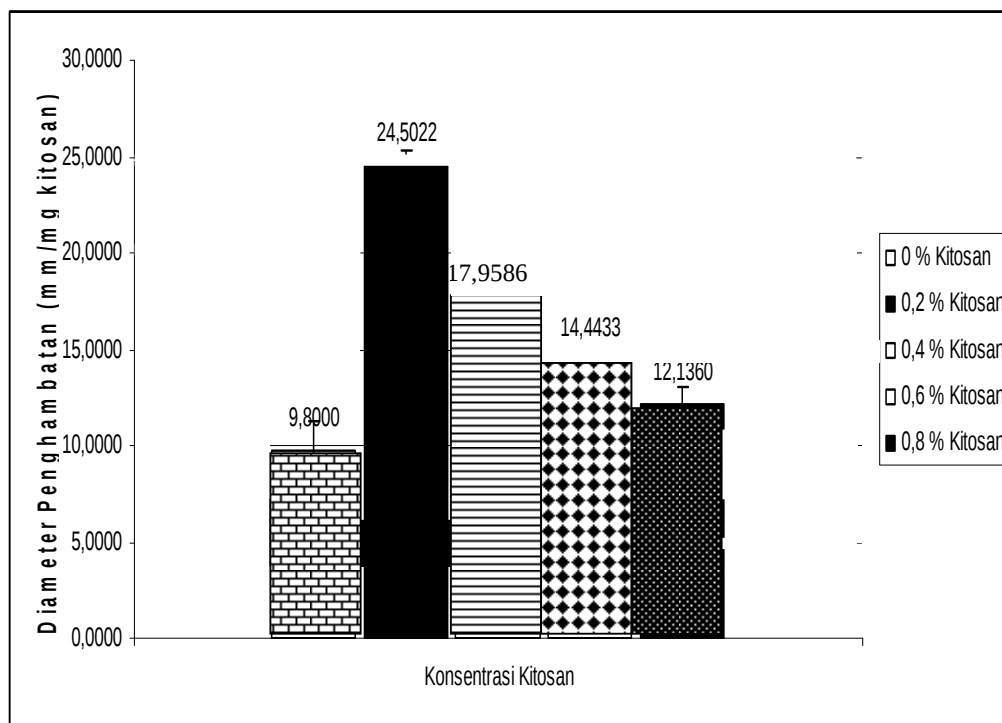
Aktivitas Anti-*Bacillus subtilis*

Hasil penelitian menunjukkan diameter penghambatan yang menurun seiring peningkatan konsentrasi kitosan. Diameter penghambatan antibakteri kitosan terhadap *Bacillus subtilis* berturut turut pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 persen (b/v) adalah 24,50; 17,96; 14,44; dan 12,13 mm/mg kitosan. Histogram diameter penghambatan kitosan secara parsial terhadap *Bacillus subtilis* disajikan pada Gambar 2.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa larutan kitosan memberikan efek penghambatan yang menurun terhadap *Bacillus subtilis*. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0% tetap terjadi penghambatan dengan diameter penghambatan sebesar 9,80 mm. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya asam asetat dalam larutan sebagai pelarut. Efek penghambatan tersebut bukan merupakan aktivitas kitosan, karena asam asetat juga memiliki kemampuan menghambat bakteri. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,2%, terjadi penghambatan tertinggi. Hal tersebut diduga karena kekentalan larutan kitosan masih rendah sehingga masih dapat berdifusi ke media percobaan tempat tumbuhnya *Bacillus subtilis*. Pada larutan kitosan

dengan konsentrasi kitosan 0,8%, terjadi penghambatan terendah. Hal tersebut diduga karena larutan kitosan 0,8% sudah terlalu

kental sehingga tidak dapat berdifusi secara baik.



Gambar 2. Histogram diameter penghambatan larutan kitosan secara parsial terhadap *Bacillus subtilis*.

Diameter penghambatan kitosan terhadap *Bacillus subtilis* yang menurun seiring penambahan konsentrasi kitosan diduga karena *Bacillus subtilis* juga merupakan jenis bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus aureus*. Hal tersebut diduga karena larutan kitosan yang diterapkan menggunakan metode sumur tidak dapat berdifusi secara baik. Ukuran molekul kitosan yang besar, dilihat dari bentuk fisik larutan kitosan yang cukup kental mendekati gel, akan mengurangi kemampuan berdifusi. Molekul kitosan yang terlalu besar tidak dapat menembus dinding sel bakteri. Akibatnya, data

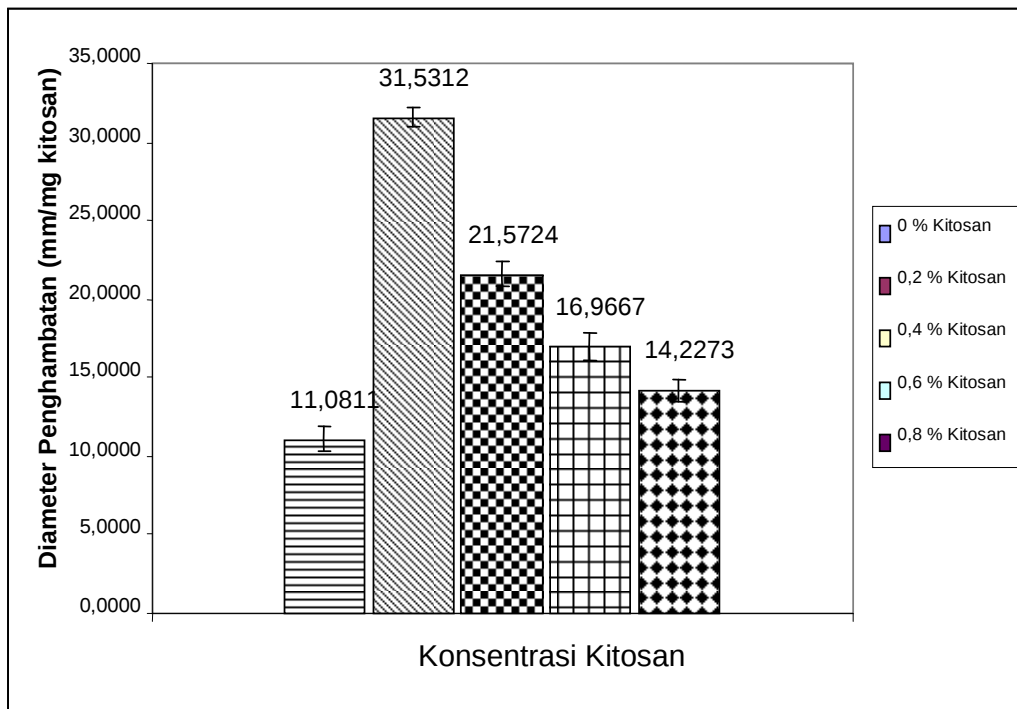
diameter penghambatan menunjukkan penurunan sifat penghambatan seiring peningkatan konsentrasi kitosan.

Aktivitas Anti-*Escherichia coli*

Berdasarkan hasil perhitungan nilai diameter konversi (d' , mm/mg kitosan) hasil penelitian dengan menggunakan metode sumur diketahui bahwa larutan kitosan menghasilkan diameter penghambatan terhadap *Escherichia coli* yang menurun seiring peningkatan konsentrasi kitosan. Diameter penghambatan antibakteri kitosan terhadap *Escherichia coli* berturut-turut pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 persen

(b/v) adalah 31,53; 21,57; 16,97 dan 14,23 mm/mg kitosan. Histogram diameter penghambatan kitosan secara parsial

terhadap *Escherichia coli* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Histogram diameter penghambatan larutan kitosan secara parsial terhadap *Escherichia coli*

Larutan kitosan memberikan efek penghambatan, terhadap *Escherichia coli* tetapi trennya juga menurun. Diameter penghambatan kitosan terhadap *Escherichia coli* yang menurun seiring penambahan konsentrasi kitosan diduga juga disebabkan ukuran molekul kitosan yang besar dilihat dari bentuk fisik larutan kitosan yang semakin kental. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,2%, terjadi penghambatan tertinggi. Hal tersebut diduga karena kekentalan larutan kitosan masih rendah sehingga masih dapat berdifusi ke media percobaan tempat tumbuhnya *Escherichia coli*. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0,8%, terjadi

penghambatan terendah. Hal tersebut diduga karena larutan kitosan 0,8% sudah terlalu kental sehingga tidak dapat berdifusi secara baik. Pada larutan kitosan dengan konsentrasi kitosan 0% tetap terjadi penghambatan dengan diameter penghambatan sebesar 11,08 mm. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya asam asetat dalam larutan sebagai pelarut. Efek penghambatan tersebut bukan merupakan aktivitas kitosan, karena asam asetat juga memiliki kemampuan menghambat bakteri. Terjadinya penurunan diameter penghambatan memang tidak diharapkan. Diameter penghambatan yang dihasilkan menurun

dari 31,53 mm/mg kitosan sampai 14,23 mm/mg kitosan.

Escherichia coli merupakan jenis bakteri Gram negatif. Menurut Yusman (2006), *Escherichia coli* lebih bermuatan negatif dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus* (bakteri Gram positif). Hal tersebut dapat terjadi karena adanya lipopolisakarida dan peptidoglikan yang mengandung gugus COO⁻ pada *Escherichia*

coli sehingga secara keseluruhan lebih bermuatan negatif daripada *Staphylococcus aureus*. Perbandingan diameter penghambatan antara bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*) dan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan diameter penghambatan antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif.

Jenis Bakteri		Diameter penghambatan berdasarkan konsentrasi (mm)				
		0%	0,2%	0,4%	0,6%	0,8%
Gram positif	<i>S. aureus</i>	4,87	20,27	9,27	8,58	6,83
	<i>B. subtilis</i>	9,80	24,50	17,96	14,44	12,14
Gram negatif	<i>E. coli</i>	11,08	31,53	21,57	16,97	14,23

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa kitosan memberikan penghambatan paling besar terhadap *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif) dibandingkan *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* yang keduanya merupakan bakteri Gram positif. Penghambatan terhadap *Escherichia coli* terjadi pada semua konsentrasi yang diberikan. Menurut Helander *et al.* (2001) mekanisme aktivitas antibakteri kitosan bisa dijelaskan sebagai berikut; muatan positif NH₃⁺ glukosamin chitosan berinteraksi dengan muatan negatif (lipopolisakarida, protein) membran sel mikroba sehingga menyebabkan kerusakan membran luar sel dan keluarnya konstituen intraselular bakteri.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Terdapat aktivitas penghambatan kitosan sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan diameter penghambatan tertinggi pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2 % sebesar 20,27 mm/mg kitosan dan terendah pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,8 % sebesar 6,82 mm/mg kitosan.
2. Terdapat aktivitas penghambatan kitosan sebagai antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dengan diameter penghambatan tertinggi pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2 % sebesar 24,50 mm/mg kitosan dan terendah pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,8 % sebesar 12,14 mm/mg kitosan.

3. Terdapat aktivitas penghambatan kitosan sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan diameter penghambatan tertinggi pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2 % sebesar 31,53 mm/mg kitosan dan terendah pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,8 % sebesar 14,22 mm/mg kitosan.
4. Kitosan memberikan efek penghambatan yang lebih tinggi pada *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif) dibandingkan pada *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* (bakteri Gram positif).
5. Semua aktivitas antibakteri kitosan semakin menurun seiring peningkatan konsentrasi kitosan di atas 0,2 %.

Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan maka disarankan untuk melakukan penelitian serupa menggunakan metode lain yang diharapkan dapat menggambarkan kemampuan kitosan dalam menghambat bakteri, dan mengaplikasikannya pada produk makanan yang lebih banyak mengandung bakteri Gram negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2005. Kian Marak Penggunaan Formalin pada Makanan: Ditemukan pada Mi Basah, Tahu dan Ikan Asin. Kompas: 28 Desember 2005.
- Apriyanto, D. 2002. Aktivitas Antibakteri Bubuk Lada (*Piper nigrum* L.) terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Makanan dengan Metode Sumur. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Unila. Bandar Lampung.
- Helander, I.M., E.L. Numiaho, R. Ahvenainen, J. Rohoades, and S. Roller. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram negative bacteria. International J. of Food Microbiol. 71: 235-244.
- Murhadi. 2002. Isolasi dan Karakteristik Komponen Antibakteri dari Biji Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassk). Disertasi. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- No, H.K., N.Y. Park, S.H. Lee, and S.P. Meyer. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weight. International J. of Food Microbiol. 74: 65-72.
- Rangga, A. 1997. Pengetahuan Bahan. Diktat Kuliah. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Unila. Bandar Lampung.
- Widodo, A., Marida, dan A. Prasetyo. 2006. Potensi Kitosan dari Limbah Udang sebagai Koagulan Logam Berat Limbah Cair Industri Tekstil. Jurusan Teknik Kimia Institut Sepuluh November (ITS). <http://www.kemahasiswaan.its.ac.id>. Diakses pada Tanggal 3 Januari 2007.
- Yusman, D.A. 2006. Hubungan Antara Aktivitas Antibakteri Kitosan dan Ciri Permukaan Dinding Sel Bakteri. Jurnal Penelitian IPB. Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. 10 hlm.
- Zheng, L.Y. and J.F. Zhu. 2002. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polimers. 54(4): 527-530.