

## UJI SITOKSISITAS CAMPURAN RESIN AKRILIK DENGAN KITOSAN SEBAGAI BAHAN GIGI TIRUAN ANTI JAMUR

*Titik Ismiyati dan Widowati Siswomihardjo*  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada  
Email: ismiyati.titik@Yahoo.co.id

*Marsetyawan H.N.E.Soesatyo*  
Fakultas Kedokteran Umum Universitas Gadjah Mada

*Rochmadi*  
Fakultas Teknik Universitas Gadjah Mada

### ABSTRACT

*Denture acrylic resin contain monomer residue that can cause allergic reactions and inflammation in the mouth. Chitosan has advantage biocompatible and antifungal. The purpose of this study was to examine toxicity acrylic resin blends with chitosan as denture antifungal in fibroblast cell culture. This study uses chitosan concentration 0.5%, 1%, 2% and 4% of 2.5 ml were blends with acrylic resin. Fibroblast cell cellular responses were assessed using MTT assay. Data at the cell viability analyzes used Anova one path ( $p < 0.05$ ). The results showed the greatest average adsorbansi fibroblast cell in blends acrylic resin was chitosan concentration of 0.5% ( $0.434 \pm 0.119$ ) with 99.810% cell viability, and the smallest average chitosan concentration of 4% ( $0.385 \pm 0.023$ ) and 88.523% cell viability. Anova test showed there were differences the effect of varying concentrations of chitosan significantly to adsorbansi and cell viability ( $p < 0.05$ ). The results of post hoc test showed a concentration of 4% was significantly different than other concentration. Conclusion, acrylic resin blends with chitosan at a concentration of 0.5%, 1%, 2% were non-toxic, being mild toxic concentration of 4%.*

**Keywords:** *Acrylic Resin; Chitosan; Cytotoxicity; Denture.*

### ABSTRAK

Gigi tiruan resin akrilik mengandung monomer sisa yang dapat menyebabkan reaksi alergi dan peradangan dalam mulut. Kitosan memiliki keunggulan yaitu biokompatibel, antijamur. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji sitoksisitas campuran resin akrilik dengan kitosan sebagai bahan gigi tiruan antijamur pada kultur sel fibroblas. Penelitian ini menggunakan kitosan konsentrasi 0,5%, 1%, 2% dan 4% sebanyak 2,5 ml yang dicampurkan dalam resin akrilik. Respon seluler sel fibroblas dinilai dengan menggunakan *MTT assay*. Data viabilitas sel di analisis menggunakan Anava satu jalur ( $p < 0,05$ ). Hasil penelitian menunjukkan rerata terbesar adsorbansi sel fibroblas pada campuran resin akrilik adalah kitosan konsentrasi 0,5% ( $0,434 \pm 0,119$ ) dengan viabilitas sel 99,810%, dan rerata terkecil kitosan konsentrasi 4% ( $0,385 \pm 0,023$ ) dan viabilitas sel 88,523%. Uji Anava menunjukkan terdapat perbedaan pengaruh variasi konsentrasi kitosan secara bermakna terhadap adsorbansi dan viabilitas sel ( $p < 0,05$ ), hasil uji post hoc menunjukkan konsentrasi 4% berbeda secara bermakna dibanding konsentrasi yang lain. Kesimpulan campuran resin akrilik dengan kitosan pada konsentrasi 0,5%, 1%, 2% termasuk kategori tidak toksik, sedang konsentrasi 4% toksik ringan.

**Kata Kunci:** *Gigi tiruan; Kitosan; Resin akrilik; Sitotoksitas.*

## PENGANTAR

Gigi tiruan dibutuhkan bagi pasien yang kehilangan gigi. Sejak tahun 1940 resin akrilik digunakan dalam bidang kedokteran gigi. Penggunaan resin akrilik sebagai bahan basis pembuatan gigi tiruan mencapai lebih dari 98% (Sakaguci dan Power, 2012). Hal ini terjadi karena resin akrilik mempunyai keuntungan manipulasi mudah, murah, estetis baik, dan warna menyerupai gingiva. Resin akrilik memiliki kelemahan yaitu proses polimerisasi pada resin akrilik tidak pernah terjadi dengan sempurna dan masih menghasilkan monomer sisa yang dapat mengakibatkan reaksi iritasi, alergi hipersensitif, dan inflamasi dalam rongga mulut pasien yang menggunakan gigi tiruan resin akrilik (Sakaguci dan Power, 2012). Inflamasi di bawah basis gigi tiruan sering diistilahkan dengan *denture sore mouth*. Resin akrilik bersifat mudah abrasi tidak tahan terhadap goresan, bersifat higroskopis, dan berpori serta mudah menyerap molekul dalam saliva yang mengandung mikroorganisme. Hal ini menyebabkan terjadi proses pembentukan koloni mikroba (McCabe dan Walls, 2008).

Penumpukan plak dan sisa makanan menyebabkan jumlah *Candida albicans* meningkat. Kemampuan *Candida albicans* untuk melekat pada permukaan mukosa merupakan proses awal suatu infeksi. Pada pemakai gigi tiruan, tipe infeksi *Candida albicans* lebih dikenal sebagai *Candida associated denture stomatitis* (Salerno, dkk., 2011). Prevalensi penderita stomatitis karena gigi tiruan mencapai lebih dari 50% (Budtz- Jorgensen, 2004). Pencegahan terjadinya denture stomatitis merupakan hal yang penting, termasuk menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dengan merendam gigi tiruan menggunakan disinfektan (Bell, dkk., 1989), tetapi perendaman tersebut dapat berefek perubahan warna, goresan dan penipisan pada gigi tiruan (Paranhos, dkk., 2007). Merendam gigi tiruan termoplastik nilon kedalam kitosan berat molekul tinggi dengan konsentrasi 0,05% (b/v) dapat mencegah pertumbuhan *Candida albicans* yang menempel pada permukaan gigi tiruan termoplastik nilon, tetapi masih didapatkan sejumlah *Candida albicans* yang masuk ke pori-pori termoplastik

nilon tersebut (Ismiyati, 2012; Ismiyati, dan Setyahadi, 2014). Oleh karena itu, perlu dibuat campuran resin akrilik dengan kitosan yang hasilnya dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan diharapkan dapat memenuhi biokompatibel yaitu uji toksisitas sebagai aplikasi dalam penerapannya pada kedokteran gigi masa kini. Untuk mengukur sitotoksitas suatu bahan menggunakan uji *MTT assay*.

Sitotoksik suatu bahan mengindikasikan kemungkinan adanya efek toksik yang akan ditimbulkan apabila material tersebut diaplikasikan secara klinis (Schmalz, dan Arinholt, 2009). Klasifikasi berdasarkan persentase jumlah sel yang viabel adalah (1) tidak sitotoksik: > 90% sel viabel. (2) Sitotoksik ringan: 60 - 90% sel viabel. (3) Sitotoksik sedang: 30 - 59% sel viabel. (4) Sitotoksik berat: < 30% sel viabel (Brunner, dkk., 2006).

Kitosan merupakan biopolimer alami yang banyak terkandung dalam limbah cangkang udang, kepiting dan tiram yang mempunyai sifat biokompatibel, biodegradasi, non toksik, dan antimikroba (Tikhonov, dkk., 2006; Boynuegri, dkk., 2009). Adanya gugus amina primer bersifat basa, gugus OH primer, dan sekunder serta gugus asetamida pada kitosan menjadikan kitosan mempunyai sifat yang berguna untuk aplikasi di bidang kesehatan. Molekul kitosan memiliki muatan positif grup amino ( $\text{NH}_2^+$ ) yang mampu berinteraksi dengan senyawa pada permukaan membrane sel yang bermuatan negatif, kemudian terabsorpsi membentuk semacam lapisan yang menghambat kerja enzim dan transportasi sel sehingga sel mengalami kekurangan substansi untuk berkembang dan mengakibatkan matinya sel (Balicka, dkk., 2005; Rasmussen, dkk., 2008; Goy, dkk., 2009).

Toksitas sebuah material adalah kemampuan material tersebut untuk merusak sistem biologis akibat paparan kimiawi. Sel fibroblas banyak digunakan untuk uji sitotoksitas material, sel fibroblas merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat, berbentuk *fusiforme* dengan tonjolan sitoplasma di setiap ujungnya (Junqueira, dan Carneiro, 2005; Portner, 2007). Fibroblas merupakan sel

yang mensintesis dan mensekresi sebagian besar makromolekul matriks ekstraseluler, dapat menstimulasi proliferasi, diferensiasi, dan peradangan. Rangsangan bahan toksik berupa jejas pada sel yang merusak membran sel, mitokondria, dan mengganggu enzim-enzim atau substrat endogen sel (Kuehnel, 2003), sehingga mengakibatkan gangguan pada proses perbaikan atau penyembuhan. Sel fibroblas jenis *vero cell line* yang berasal dari ginjal kera hijau Afrika merupakan sel yang digunakan dalam penelitian tingkat *in vitro*. Sel ini disimpan di cairan nitrogen atau pada suhu - 80°C dan dapat diaktifkan jika ingin dibiakkan untuk kepentingan penelitian (Cotran, dkk.,1999).

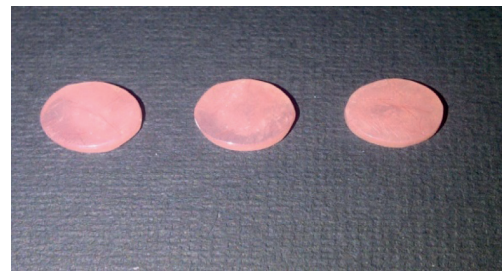
Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi secara *in vitro* sitotoksitas campuran resin akrilik dengan kitosan sebagai bahan gigi tiruan antijamur.

## Metode

Jenis penelitian ini adalah ekperimental laboratorium. Metode yang digunakan adalah metode *MTT Assay*. Bahan penelitian yang digunakan adalah (a) Resin akrilik kuring panas ( merk stellon QC 20, Detrey, Inggris); (b) Kitosan konsentrasi 0,5%, 1%, 2%, dan 4%; (c) gips; (d) malam merah; (e) *Phosphat buffer saline* 1x; (f) media kultur (MK) (DMEM/RPMI/MEM); (g) DMSO; (h) MTT 5mg/mL PBS (50 mg MTT and 10 mL PBS); (i) SDS 10% dalam 0,01 N HCl; dan (j) Aluminium foil. Alat yang digunakan (a) Stellon pot; (b) Kuvet; (c) Pres; (d) *Crownmes*; (e) Mikropipet 200, 1000 µL; (f) Tabung reaksi kecil; (g) Rak tabung kecil; (h) 96-well plate; (i) *Conical tube*; (j) *Yellow tip* dan *blue tip*; dan (k) *ELISA reader*.

Cara penelitian: Pembuatan sampel campuran resin akrilik terdiri polimer dan monomer dengan perbandingan= 2,5:1 (Combe, 1992). Volume masing masing konsentrasi kitosan 2,5 ml. Kelompok 1 (satu) sebagai kontrol tanpa penambahan kitosan; Kelompok 2 (dua) resin akrilik dicampurkan dengan kitosan konsentrasi 0,5%; Kelompok 3 (tiga) resin akrilik dicampurkan dengan kitosan konsentrasi 1%; Kelompok 4 (empat) resin akrilik dicampurkan dengan kitosan

konsentrasi 2%; dan kelompok 5 (lima) resin akrilik dicampurkan dengan kitosan konsentrasi 4%. Pencampuran dilakukan sampai mencapai *fase dough*, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet yang telah ada cetakan berbentuk cakram diameter 10 mm dan tebal 2mm, Setelah itu dilakukan pengepresan, proses polimerisasi dilakukan dengan menggunakan pemanasan air pada suhu 70° selama 90 menit dilanjutkan suhu 100° selama 30 menit.



Gambar 1. Sampel penelitian

Awal pengujian MTT assay, dilakukan kultur sel fibroblast dalam bentuk *cell line* yang ditanam dalam botol. Setelah *confluent*, kultur dipanen dengan menggunakan larutan *trypsine*. Hasil panen diambil 2ml dan ditanam kembali dalam media *eagle* yang mengandung 10% bovine serum albumin Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sel dipindahkan dalam botol kecil dan dibuat kepadatan  $2 \times 10^5$  sel/µl, sel siap digunakan sebagai pengujian. Selanjutnya sel diambil, dimasukkan ke dalam medium yang mengandung DMEM, FBS 10%, Streptomycin sebagai antibiotik, dan Hepes untuk menyesuaikan PH. Media disentrifugasi agar sel merata dalam media, dan dituangkan kedalam sumur atau *well microplate* masing-masing 100 µl sel sebanyak 99 sumuruan/*well*. *Microplate*. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian dilihat dengan mikroskop elektron apakah sel sudah menempel pada *well*. Kontrol positif berisi sel dalam media kultur dan kontrol negatif hanya berisi media kultur tanpa adanya sel.

Sampel disterilkan terlebih dahulu dengan ultra violet selama 20 menit. Kemudian sampel dimasukkan kedalam *well*, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada sampel

ditambahkan pereaksi 5 ml MTT yang telah dilarutkan dalam 1 ml PBS, kemudian diambil 10 ml media sel (M199/DMEM). Setelah disentrifugasi, larutan tersebut dimasukkan kedalam setiap sumur sejumlah 100 µl pada *microplate* sebanyak 99 sumuran. Setelah diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C, dilakukan pengambilan sampel, setiap *well* diberi *stop solution* (SDS dalam HCL)

Sesuai ISO 10993-5 (2009) Nilai densitas optik formazan dihitung dengan spektrofotometer pada gelombang 540 nm. Sitositas diukur berdasarkan viabilitas sel relative terhadap kontrol dengan rumus

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\text{perlakuan} + \text{media}}{\text{Sel} + \text{media}} \times 100\%$$

Keterangan :

% viabilitas sel : persentase jumlah sel hidup setelah pengujian

Perlakuan : nilai densitas optik formazan pada setiap sampel setelah pengujian

Media : nilai densitas optik formazan pada kontrol media

Sel : nilai densitas formazan pada kontrol sel

Untuk melihat perbedaan persentase sel hidup pada perbandingan antar kelompok penelitian, data yang diperoleh dianalisis dengan Anava satu jalur.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui biokompatibilitas material pada penelitian ini digunakan uji MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]. Plat gigi tiruan bentuk cakram diameter 10 mm tebal 2 mm yang dibuat dari campuran material resin akrilik kuring panas dengan kitosan konsentrasi 0,5% 1%, 2% dan 4%. Plat di kontakkan pada permukaan sel fibroblas dan di inkubasi hingga didapatkan kultur sel menyerupai jaringan asalnya (*confluent*). Selama masa inkubasi, bahan kimia yang luruh dalam uji materi dapat berdifusi ke dalam medium kultur. Reaktivitas

sampel uji akan menyebabkan malformasi, degenerasi, dan lisis sel di sekitar bahan uji.



Gambar 2.  
*Seeding* sel fibroblas



Gambar 3.  
Kultur sel dalam MTT sesudah kontak sampel

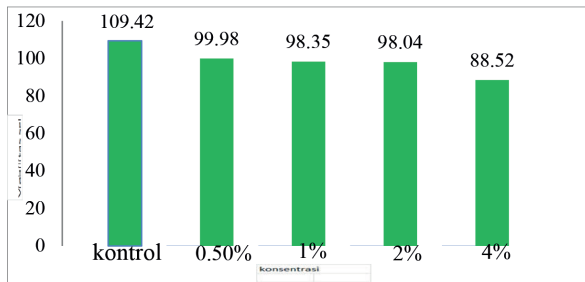
Sel yang dipanen dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (Gambar 2) adalah kelompok yang tidak diberi campuran resin akrilik dengan kitosan. Kelompok perlakuan (Gambar 3) terdiri dari kelompok sel yang telah diberi campuran resin akrilik dengan kitosan dengan konsentrasi tertentu. Pengukuran viabilitas sel fibroblas berdasarkan intensitas kristal formazan berwarna ungu yang dibaca dengan *microplate reader*. Intensitas warna ungu proposional dg jumlah sel yg hidup. Hasil penelitian ini, pada konsentrasi semakin besar maka kristal formazan yang dihasilkan semakin sedikit. Medium intensitas warna ungu berkurang, hal ini berarti pada konsentrasi semakin besar, jumlah sel yang hidup berkurang.

Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dihitung rerata nilai absorbansinya dan simpangan baku dalam masing masing konsentrasi dan viabilitas sel fibroblast dapat dilihat pada Tabel berikut.

Tabel 1  
Hasil Rerata dan standar deviasi nilai absorbansi dan viabilitas sel fibroblas

Kelompok	Rerata ± SD	Viabilitas sel (5)
<b>Kontrol</b>	<b>0.435 ± 0,008</b>	<b>109,420%</b>
Konsentrasi 0,5%	0.434 ± 0.119	99.980%
Konsentrasi 1%	0.428 ± 0.008	98.354%
Konsentrasi 2%	0.427 ± 0.005	98.048%
Konsentrasi 4%	0.385 ± 0.023	88.523%

Tabel di atas menunjukkan terdapat perbedaan nilai rerata pada setiap kelompok perlakuan. Nilai rerata kelompok perlakuan sel terbesar terdapat pada kelompok kitosan konsentrasi 0,5%, yaitu  $0.434 \pm 0,119$  dengan viabilitas sel 99,980%. Nilai rerata terendah terdapat pada kelompok kitosan konsentrasi 4%, yaitu  $0.385 \pm 0.023$  dengan viabilitas sel fibroblast 88,523%, dapat digambarkan dalam diagram berikut ini.



Gambar 4  
Viabilitas sel pada variasi konsentrasi

Uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi  $0,053 > 0,05$ , berarti antara data berdistribusi normal. Uji homogenitas dihitung dengan menggunakan Levene, hasil signifikansinya 0,228 yang berarti data sampel adalah homogen  $p > 0,05$ , sehingga penghitungan dapat dilanjutkan uji statistik Anava satu jalur. Hasil uji Anava menunjukkan F hitung  $(14,551) > F$  tabel  $(3,32)$  atau nilai signifikansi  $p < 0,05$ . Berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada variasi konsentrasi kitosan. Selanjutnya untuk mengetahui konsentrasi yang paling berbeda diantara kelima kelompok dilakukan uji *post hoc* Tukey. Hasil uji Tukey menunjukkan kelompok kontrol dengan kelompok kon-

sentrisi kitosan 0,5%, 1% dan 2% tidak berbeda, tetapi terdapat perbedaan pada kelompok konsentrasi 4%.

Hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan dari nilai rerata kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan konsentrasi 0,5%, 1%, 2% dan nilai paling rendah pada kelompok 4%. Hal ini menunjukkan bahwa pada semua konsentrasi kitosan pada campuran resin akrilik dengan kitosan sebagai gigi tiruan mempunyai efek terhadap viabilitas sel.

Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup setelah terpapar kitosan. Jadi kitosan mempunyai efek toksik terhadap viabilitas sel. Hal ini terjadi karena kitosan dapat menekan apoptosis sel dengan cara mendenaturasi protein sel di membrane sel yang menyebabkan perubahan permeabilitas sel. Selanjutnya membran sel tidak dapat mempertahankan komponen-komponen yang ada di dalam sel dan mengacaukan aliran bahan yang keluar dan masuk sel, pada akhirnya mengakibatkan sel mati (Schmalz, dan Bindslev., 2009). Muatan positif dari gugus amino pada kitosan mempunyai kemampuan untuk berinteraksi dengan membrane sel yang bermuatan negatif. Selanjutnya terabsorpsi membentuk semacam lapisan yang menghambat saluran transformasi ion sel dan menghambat kerja enzim, sehingga sel mengalami kekurangan substansi untuk berkembang dan mengakibatkan sel mati (Balicka, dkk., 2005; Rasmussen, dkk., 2008; Goy, dkk., 2009). Amina yang terkandung dalam kitosan mempunyai sifat toksik bagi sel, tetapi timbulnya respon toksik dipengaruhi oleh adanya dosis dan konsentrasi dari bahan kimia yang diberikan.

Hasil penelitian ini didapatkan semakin besar konsentrasi kitosan, maka semakin kecil nilai rerata absorbansi dan viabilitas sel. Hal ini terjadi karena pada kitosan konsentrasi besar lebih banyak muatan negatif yang menempel di dinding sel yang menyebabkan membrane sel akan lebih cepat rusak dan terdapat apoptosis. Konsentrasi 0,5%; 1%; dan 2% mempunyai viabilitas sel besar dan sesuai klasifikasi berdasarkan persentasi jumlah sel yang viable Pada konsentrasi tersebut

termasuk dalam kategori tidak toksik (> 90% sel viabel), sedang pada konsentrasi 4% pada penelitian ini termasuk dalam kategori toksik ringan (60-90% sel viabel) (Brunner,dkk., 2006).

Penghitungan statistik pada kelompok yang berbeda adalah kelompok konsentrasi kitosan 4%. Jejas yang terjadi pada sel dipengaruhi oleh berat ringannya stimulus yang diperoleh sel (Kuehnel, 2003). Konsentrasi kitosan berperan dalam menentukan berat ringannya stimulus yang akan mengakibatkan jejas hingga kematian. Pada penelitian ini respon jejas terhadap kitosan konsentrasi 0,5%; 1%; dan 2% hasilnya signifikan, tetapi pada konsentrasi 4% terdapat penekanan viabilitas sel. Berarti terdapat sel yang sudah tidak mampu beradaptasi sehingga mengalami kerusakan dan kematian. Akan tetapi, pada konsentrasi 4% terdapat viabilitas sel 88; 523%; dan menurut ISO 10993-5, suatu zat dapat diterima secara klinis apabila viabilitas sel >70%. Kesimpulan pada penelitian ini adalah campuran resin akrilik dengan kitosan pada konsentrasi 0,5%;1%; dan 2% tidak toksik dan 4% toksik ringan, tetapi masih dapat diterima secara klinis.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristek yang telah memberikan bantuan dana dan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada serta Ketua Program Studi S3 Fakultas Kedokteran Gigi yang telah mendukung dalam penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

Balicka-Ramisz,A., Pajak,A.W., Pilarczyk,B., Ramisz, A., Laurans, L., 2005, Antibacterial and Antifungal Activity of chitosan, *ISAH - Warsawa, Poland* Vol 2 :406-408.

Bell,J.A., Brockmann,S.L, Feil,P., Sackovich, D.A., 1989, The Effectiveness of Two Disinfectans on Denture Base Acrylic Resin With An Organik load, *J.Prosthet.Dent.*, 61 (5) : 580 – 582

Boynuegri,D., Ozcan g., Senel,S., Uc,d., Uraz,a., Oqus, E., Cakilci,B.,

Karaduman, B., 2009, Clinical and radiographic evaluation of Chitosan gel in Periodontal intraosseus defect: a Pilot study, *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 90B (1) : 461-466

Brunner,T.J., Wick,P., Manser,P., Spohn,P., Grass, R.N., Limbach,L.K., Bruinink, A., and Stark,W.J., 2006, In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparation to Asbestos, Silica, and The Effect of particle solubility, *Environ Sci Technol*, 40 : 4374 -81

Budtz- Jorgensen,E., 2004, *Sequelae caused by wearing complete dentures*,dalam Zarb,G.A., Bolender,C.L., Prosthodontic treatment for edentulous patients Complete denture and implant -supported prostheses, 12<sup>th</sup> ed., Mosby Inc., St. Louis, 34-50.

Combe, E.C., 1992, *Notes on Dental Materials*, 6<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, New York, 223- 5

Cotran, M.D., Kumar, V., dan Collins, T., 1999, *Robbins pathologic of disease*, 6<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, h:6-8, 4-15, 102-110.

Goy, R.C., Britto,D., Assis,O.B.G., 2009 A. Review of The Antimicrobial Activity of Chitosan, *Polimeros : Ciencia etecnologia* , 19 (3) : 1-7

Ismiyati,T., 2012, Effectiveness of High Molecular Weight Chitosan on The Growth of Candida Albicans in Thermoplastic Nylon Denture. *Proceeding Book The snd International Joint Symposium on Oral and dental Science in Conjunction with Dental Specialists seminar*.h. 281- 285

Ismiyati, T., dan Setyahadi, S., 2014 Antifungal of Thermoplastic Nylon Denture Base Plate Incorporate with Nanoparticles High-Density Chitosan, *Journal of Chitin and Chitosan Sciences*, Vol 2, h. 1-7

ISO10993-5, 2009, *Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5 : Test for in vitro cytotoxicity*, h.28

- Junqueira, L.C., dan Carneiro, C., 2005, *Basic Histology: Text and atlas*, 11<sup>th</sup> ed., Sao Paulo: Mc Graw Hill, h.502
- Kuehnel, W., 2003, *Color atlas of cytology, histology, and microscopic anatomy*, Thieme, USA, h.268-270
- McCabe, F., walls, W.G., 2008, Intelligent Chitosan -based hydrogels as Multifunctional materials, dalam Shahinpoor, m., Schneider, H.(eds), *Intelligent Materials*, Royal Society of Chemical, Cambridge, h, 448
- Paranhos, H.F., Silva, C.H., Souza, R.F., Cruz, P.C., Freitas, K.M., Peracini, A., 2007, Effect of Mechanical & Chemical Methodes on Denture Biofilm Accumulation, *J. Oral Rehabil* 34 (8) : 607-12
- Portner, R., 2007, *Animal cell biotechnology: methods and protocols*, 2<sup>nd</sup> ed, New Jersey: Humana Press Inc, h.212-214
- Rasmussen, R.S., dan Morrisey, M.T., 2008, Chitin and Chitosan, *marine Nutra-ceuticals nd Function Food*, CRC Press, New York
- Sakaguci R.L., dan Power J.M., 2012, *Craig's Restoratie Dental Materials*, 13<sup>th</sup> ed., Elsevier Mosby, Philadelphia p.162-91
- Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito,., Busciolano, M., Millilo, L., Guide, A., Petruzzi, M., Serpico, L., 2011, Candida-Associated denture Stomatitis, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16 (2) : 139 - 43
- Schmal G., dan Arenholt B.D., 2009, *Biocompatibility of Dental materials*, Springer, New York, h. 13-17, 99- 111
- Tikhonov, V., E., Stepnova, E.A., Babak, V.G., Yamskov, I.A., Palma-Guerrero, J., Jansson, h., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., Gerasimenko, D.V., Avdienko, I.D., Varlamov, V.P., 2006, Bactericidal and Antifungal activities of a Low Molecular Weight Chitosan and Its N-/2(3)-(Dodec-2-Enyl)Succinoyl/-Derivatives, *Carbohydr, polym*, 64 ; 66 - 72.