SINTESIS DAN KARAKTERISASI SELULOSA BAKTERI-SITRAT-KITOSAN SEBAGAI PEMBALUT LUKA ANTIMIKROBA

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE-CITRATE-CHITOSAN AS ANTIMICROBIAL WOUND DRESSING

Farah Nurlidar, Lely Hardiningsih dan Darmawan Darwis

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN,
Kawasan BATAN, Pasar Jumat, Jakarta Selatan, Indonesia
Email: farah@batan.go.id

Diterima: 19 Agustus 2013, Direvisi: 8 Agustus 2013, Disetujui: 2 September 2013

ABSTRAK

Selulosa bakteri yang diproduksi oleh bakteri *Acetobacter xylinum* merupakan material yang sangat baik untuk digunakan sebagai pembalut luka karena kandungan airnya yang tinggi, sifat tersebut sangat baik untuk menjaga kelembapan luka sehingga mempercepat penyembuhan luka. Akan tetapi, selulosa bakteri (BC) tidak memiliki sifat anti bakteri, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan pembalut luka antimikroba berbasis selulosa bakteri dan kitosan. Hasil penelitian menunjukkan pembentukan selulosa bakteri-kitosan melalui reaksi menggunakan asam sitrat meningkatkan kapasitas absorpsi dan sifat antimikrobanya. Komposit tersebut memberikan nilai kapasitas absorpsi dalam air DM sebesar 21.5 g/g dan kapasitas absorpsi dalam larutan salin (NaCl 0,9%) sebesar 8.2 g/g, sifat ini sangat penting bagi pembalut luka untuk menyerap eksudat luka pada luka yang berair. Karakterisasi laju transmisi uap air/ WVTR (Water Vapour Transmission Rate) juga menunjukkan nilai WVTR semua sampel yang di uji di bawah nilai WVTR kontrol tanpa pemberian sampel. Selain itu, selulosa bakteri-sitrat-kitosan (BC-AST) juga menunjukkan sifat antimikroba yang baik terhadap *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* dan *S. aureus*.

Kata kunci: Antimikroba, asam sitrat, kitosan, pembalut luka, selulosa bakteri

ABSTRACT

*Bacterial cellulose, produced by Acetobacter xylinum, is an interesting material for using as a wound dressing since it provides moist environment to a wound resulting in a better wound healing. However, bacterial cellulose (BC) itself has no antibacterial activity to prevent wound infection. To achieve antibacterial activity, chitosan were impregnated into bacterial cellulose by crosslinking reaction using citric acid as crosslinker. The thickness, water and saline absorption capacity, water vapour transmission rate (WVTR), mechanical properties and antibacterial activity of composite were investigated. The result show an important increase in absorption capacity when BC was treated with citric acid and chitosan and the maximum value was reached at 21.5 g/g in DM water and 8.2 g/g in saline solution). The WVTR analysis of all the test membranes was found to be less than WVTR value of control without sample. The result also showed that bacterial cellulose-citrate-chitosan (BC-AST) exhibited antibacterial activity against *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* and *S. aureus**

Keywords: Antibacterial, bacterial cellulose, citric acid, chitosan, wound dressing.

PENDAHULUAN

Selulosa bakteri (BC) merupakan material yang sangat menarik dan telah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti, industri makanan misalnya *nata de coco*, industri kertas (produk kertas tahan api), dan juga dalam bidang kedokteran sebagai pembalut luka dan material pada regenerasi tulang dan jaringan⁽¹⁻³⁾.

Di dalam bidang kedokteran, membran BC memiliki potensi yang sangat baik untuk digunakan sebagai pembalut luka, karena memiliki kandungan air yang tinggi (98-99%)^(1,2,4). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kemampuan menyerap air pada pembalut luka sangat diperlukan untuk menjaga tingkat kelembaban luka pada tingkat tertentu sehingga proses penyembuhan dapat berjalan optimal. Selain itu, karakteristik penting lain dari pembalut luka adalah sebagai pelindung terhadap benturan fisik dan masuknya infeksi mikroorganisme dari luar^(1,5). Infeksi mikroorganisme terhadap luka dapat berakibat pada kerusakan jaringan yang lebih parah dan dapat membahayakan jiwa pasien⁽⁵⁾.

BC diketahui sangat baik untuk digunakan sebagai pembalut luka dan mempercepat proses penyembuhan pada luka bakar dan kronis⁽¹⁾. Akan tetapi, BC tidak memiliki sifat antimikroba untuk mencegah terjadinya infeksi sekunder pada luka. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan modifikasi BC untuk meningkatkan sifat antimikrobanya.

Kitosan merupakan biopolimer turunan dari kitin dan memiliki aktifitas biologi yang baik diantaranya bersifat antimikroba. Oleh karena itu, kitosan banyak digunakan dalam berbagai bidang diantaranya, bidang kedokteran, farmasi, makanan dan pertanian^(6,7). Selain itu, beberapa penelitian menyebutkan produk degradasi kitosan oleh enzim dalam tubuh manusia dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan menstimulasi proses regenerasi jaringan⁽⁷⁾. Dalam

penelitian ini, asam sitrat digunakan sebagai agen pengikat silang⁽⁸⁾. Selain itu, keberadaan gugus sitrat dalam selulosa bakteri juga diharapkan dapat meningkatkan sifat antimikroba dari BC, hal ini dikarenakan sitrat memiliki sifat antimikroba yang baik terhadap beberapa bakteri seperti, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)^(9,10).

Penelitian ini bertujuan meneliti kemungkinan pemakaian selulosa bakteri-sitrat-kitosan sebagai pembalut luka antimikroba. Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian berupa kekuatan tarik, kapasitas absorpsi, laju transmisi uap air (LTUR) dan aktivitas antimikrobanya terhadap beberapa bakteri yaitu: *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *E. coli* dan *S. aureus*.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Air kelapa, bakteri *Acetobacter xylinum*, amonium sulfat (Merck), asam asetat glasial (Merck), sodium hidroksida (Merck), asam sitrat (Merck), kitosan (DD 70-75%, produksi BATAN) dan sodium klorida (Merck).

Peralatan

Peralatan gelas, *thickness gauge* (Mitutoyo, Jepang), alat uji kekuatan tarik (*Strograph* R1, Toyoseiki, Jepang), oven blower (Precision, USA), oven pemanas (Fischer model 301, USA), oven inkubator (HiTEC, Yamato, Jepang) dan neraca analitik (Sartorius, model BL 210 S).

Metoda

Pembuatan Selulosa Bakteri

Selulosa bakteri dibuat dari hasil fermentasi bakteri *Acetobacter xylinum* dalam media air kelapa sesuai dengan modifikasi prosedur yang dilakukan oleh Darwis dkk.⁽¹¹⁾. Satu liter air kelapa yang telah disaring dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 20% (b/v) sukrosa dan 0,5% (b/v) amonium sulfat, larutan kemudian diaduk sampai

homogen dan dilakukan penambahan asam asetat glasial (p.a) sampai pH 4. Campuran tersebut selanjutnya dipanaskan hingga mendidih, kemudian didinginkan dan ditambahkan 20% (v/v) *starter A. xylinum* dan di inkubasi selama 4-6 hari pada suhu $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Pelikel selulosa bakteri yang dihasilkan dimurnikan dengan menggunakan larutan NaOH 0,1 M pada suhu $60-65^\circ\text{C}$ selama 4 jam dan dicuci dengan air demineralisasi (DM) hingga pH netral. Pelikel yang telah murni di simpan dalam air demineralisasi pada suhu $+10^\circ\text{C}$.

Pembuatan Selulosa Bakteri -Kitosan (BC-CH)

Pelikel selulosa bakteri direndam dalam larutan kitosan 1% (b/v) dalam asam asetat 0,5% (v/v) pada suhu kamar selama 24 jam. Selanjutnya, pelikel dicuci dengan air DM sebanyak 3×50 mL untuk menghilangkan sisa kitosan dan kemudian dikeringkan dengan menggunakan *oven blower* pada suhu kamar hingga kadar airnya $+5\%$.

Pembuatan Selulosa Bakteri-Sitrat-Kitosan (BC-AST)

18 g pelikel selulosa bakteri direaksikan dengan 20 mL larutan asam sitrat 5% (b/v) dan NaH_2PO_4 1% (b/v) pada suhu 140°C selama 3 jam. Selanjutnya, pelikel dicuci dengan air DM sebanyak 3×50 mL untuk menghilangkan sisa-sisa asam sitrat. Pelikel kemudian direaksikan dengan larutan kitosan 1% (b/v) dalam asam asetat 0,5% (v/v) pada suhu 140°C selama 3 jam (BC-AST3) dan 5 jam (BC-AST5), reaksi dilakukan pada pH 4 dengan menambahkan larutan natrium asetat 1 M. Hasil reaksi dicuci dengan air DM sebanyak 3×50 mL. Pelikel selulosa bakteri-sitrat-kitosan selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan *oven blower* pada suhu kamar hingga kadar airnya $+5\%$.

Berat dan Ketebalan Membran

Berat membran BC diukur secara

gravimetri menggunakan neraca analitik (Sartorius, model BL 210S), sedangkan ketebalan membran BC diukur menggunakan alat *thickness gauge* (Mitutoyo, Jepang) dengan ketelitian 0,01 mm. Hasil pengujian merupakan nilai rata-rata dari tiga kali pengukuran.

Kapasitas Absorpsi

Pengujian kapasitas absorpsi dilakukan dengan metoda gravimetri. Membran BC, BC-CH dan BC-AST direndam dalam air DM dan larutan salin (NaCl 0,9%) selama waktu tertentu kemudian diambil dan air yang menempel pada permukaan sampel dikeringkan perlahan (*gently blotting*) menggunakan kertas saring. Kapasitas absorpsi (g/g) dihitung dengan menggunakan persamaan (1), yaitu:

$$\text{Kapasitas Absorpsi (g/g)} = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right)$$

Keterangan:

W_t = berat sampel setelah menyerap air selama t jam (g)

W_0 = berat awal sampel (g)

Kekuatan Tarik

Kekuatan tarik BC diuji dengan alat uji kekuatan tarik tipe Stograph R1 (Toyoseiki Co.Ltd., Jepang). Membran dibentuk *dumbbell* sesuai ASTM D-1822-L dan ditarik dengan kecepatan *crosshead* 25 cm/menit. Kekuatan tarik rata-rata dihitung dari lima kali pengukuran.

Laju Transmisi Uap Air (LTUR)

Laju transmisi uap air dilakukan dengan menggunakan metoda yang dideskripsikan dalam ASTM E 96-95. Pada metoda ini, wadah aluminium (diameter lubang terbuka=36 mm) diisi dengan air DM dan pada bagian lubang terbukanya ditutupi dengan membran BC, sekeliling membran kemudian diberi lilin (*wax*) untuk mencegah penguapan air. Wadah aluminium tersebut kemudian

disimpan dalam oven tertutup pada suhu 37°C dan kelembaban relatif 49%. Penguapan air melalui membran BC diamati dengan mengukur berat air yang hilang sebagai fungsi waktu ^(5,12). Nilai LTUR dihitung menggunakan gradien/kemiringan kurva antara waktu (jam) dan berat air (g) yang hilang oleh penguapan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$LTUR = \frac{\text{gradien} \times 24}{A} \text{ g/m}^2 / \text{hari}$$

Dimana, A = Luas area membran dalam m².

Uji Antimikroba

Pengujian antimikroba membran BC dilakukan dengan metoda difusi agar menggunakan bakteri gram-positif dan gram-negatif yaitu *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *E. coli* dan *S. aureus*. Metoda ini menggunakan 2 lapis medium agar, lapisan pertama yaitu lapisan dasar/*base layer* dan lapisan kedua yaitu lapisan yang mengandung bakteri/*seed layer*¹³. *Base layer* dibuat dengan menempatkan 12 mL medium agar steril ke dalam cawan petri steril, setelah *base layer* membeku kemudian ditambahkan 8 mL medium agar yang mengandung bakteri dengan konsentrasi tertentu sehingga konsentrasi akhir pada medium agar tersebut berkisar antara 10⁶–10⁸ koloni/mL, hasil perhitungan jumlah koloni masing-masing bakteri disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Tipe dan konsentrasi bakteri yang digunakan

Bakteri	Tipe Bakteri	Konsentrasi bakteri (koloni/mL)
<i>Salmonella typhi</i>	Gram-negative bacilli	1,7 x 10 ⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negative bacilli	2,1 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negative bacilli	4,3 x 10 ⁷

<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positive cocci	1,4 x 10 ⁷
------------------------------	---------------------	-----------------------

Setelah lapisan agar yang mengandung bakteri memadat, membran BC berdiameter 0,5 cm diletakkan dipermukaan lapisan *seed layer* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antimikroba membran BC ditentukan berdasarkan ada/tidaknya zona inhibisi yang terbentuk di sekeliling membran.⁽²⁾

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kapasitas absorpsi

Kapasitas absorpsi merupakan parameter penting yang harus dimiliki oleh pembalut luka. Sifat ini diperlukan pada luka berair, dimana sifat kapasitas absorpsi yang tinggi dapat berfungsi sebagai penyerap eksudat luka ^(1,5). Hasil pengujian kapasitas absorpsi BC dalam air DM dan air salin (NaCl 0,9%) disajikan pada Tabel 2. Perbedaan kapasitas absorpsi antara BC dan BC-CH dapat dijelaskan berdasarkan fasa kristalin dan amorf dari BC. Kemampuan menyerap air dari BC berkaitan erat dengan fasa amorfnya. Semakin sedikit jumlah fasa amorf, maka akan semakin sedikit pula jumlah air yang terjebak secara fisik di dalam fasa amorf BC. Selain itu, pada BC-CH terjadi interaksi berupa ikatan hidrogen intermolekular antara gugus –OH dari BC dan gugus –NH₂ dari kitosan, terjadinya ikatan ini membuat struktur BC menjadi lebih rigid/rapat sehingga mengurangi kapasitas absorpsinya⁽⁷⁾.

Kapasitas absorpsi BC mengalami peningkatan setelah direaksikan dengan asam sitrat dan kitosan. Kapasitas absorpsi maksimum diberikan oleh BC-AST3 (21,5 g/g dalam air DM dan 8,2 g/g dalam larutan salin). Peningkatan kapasitas absorpsi tersebut disebabkan oleh penambahan gugus asam karboksilat pada BC dari reaksi antara BC dan asam sitrat yang diikuti dengan reaksi dengan kitosan

⁽⁸⁾. Terjadinya reaksi antara BC, sitrat dan kitosan juga ditunjukkan oleh penambahan berat dan tebal BC-AST3 dan BC-AST5 dibandingkan BC dan BC-CH seperti disajikan pada Tabel 2.

Kekuatan tarik

Hasil kekuatan tarik BC disajikan pada Tabel 2. Membran BC pada penelitian ini memberikan kekuatan tarik yang tinggi sebagai hasil dari ikatan hidrogen intramolekuler dan intermolekuler⁽²⁾. Penambahan kitosan pada BC-CH menurunkan kekuatan tarik BC, hal ini dikarenakan berkurangnya derajat kristalinitas dari BC-CH⁽⁷⁾. Penurunan kekuatan tarik juga diberikan oleh BC-AST3 dan BC-AST5. Indriyati dkk. menyebutkan bahwa keberadaan fasa eksternal pada BC cenderung menurunkan kekuatan ikatan hidrogen intermolekuler sehingga menurunkan kekuatan tariknya⁽¹⁴⁾.

Laju Transmisi Uap Air (LTUR)

Laju penguapan air yang tinggi pada permukaan luka sangat berpengaruh terhadap kecepatan penyembuhan luka. Oleh karena itu, pembalut luka diperlukan untuk mencegah penguapan air secara berlebihan dari permukaan luka. Hasil

penelitian memberikan data bahwa laju penguapan uap air (LTUR) untuk kulit normal adalah $204 + 12 \text{ g/m}^2/\text{hari}$, sedangkan untuk kulit yang terluka berkisar antara $278,4 + 26,4 - 5138,4 + 201,6 \text{ g/m}^2/\text{hari}$ ^(5,12). Berdasarkan hal tersebut, nilai LTUR pembalut luka direkomendasikan pada rentang 2000-2500 $\text{g/m}^2/\text{hari}$, nilai ini dianggap cukup untuk menjaga kelembaban luka dan mencegah dehidrasi luka ^(5,12). Besarnya penguapan air (g) sebagai fungsi waktu dari membran BC, BC-CH, BC-AST3 dan BC-AST5 disajikan pada Gambar 1. Gradien/kemiringan dari setiap garis menunjukkan nilai transmisi uap air (g) per jam, nilai gradien ini kemudian dikonversikan menjadi nilai LTUR lewat persamaan (2) ^(5,12).

Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa kontrol tanpa pemberian membran memberikan nilai penguapan air yang sangat tinggi dan penguapan air berkurang secara signifikan dengan penggunaan membran BC. Hasil ini mengindikasikan bahwa membran BC sangat berpotensi untuk digunakan sebagai pembalut luka karena dapat menjaga kelembaban dan mencegah penguapan air secara berlebihan.

Tabel 2. Pertambahan berat, tebal, kekuatan tarik, kapasitas absorpsi dalam air DM dan larutan salin (NaCl 0,9%) dari membran BC, BC-CH, BC-AST3 dan BC-AST5.

Sampel	Berat (mg)	Tebal (mm)	Absorpsi Air (air DM) (g/g) dalam 1 jam	Absorpsi Salin (NaCl 0,9%) (g/g) dalam 1 jam	Kekuatan Tarik (N/mm ²)
BC	5,9 0,45	+ 0,05 + 0,003	1,6 + 0,1	1,2 + 0,2	147,8 + 25,1
BC-CH	8,1 0,25	+ 0,06 + 0,008	1,2 + 0,1	1,2 + 0,2	119,0 + 29,3
BC- AST3	13,2 0,51	+ 0,22 + 0,031	21,5 + 0,6	8,2 + 0,5	11,8 + 3,4
BC- AST5	17,9 0,91	+ 0,27 + 0,010	9,0 + 1,3	6,8 + 1,0	9,1 + 0,8

Gambar 1. Kurva penguapan air (g) sebagai fungsi waktu pada uji LTUR untuk kontrol (tanpamembran), membran BC, BC-CH, BC-AST3 dan BC-AST5.

Tabel 3. Nilai LTUR dari membran BC, BC-CH, BC-AST3 dan BC-AST5.

Sampel	Diameter Lubang (m ²)	Gradien	LTUR(g/ m ² /hari)
Kontrol	10,183 x 10 ⁻⁴	0,433	10205,39
BC	10,183 x 10 ⁻⁴	0,084	1979,80
BC-CH	10,183 x 10 ⁻⁴	0,080	1885,52
BC-AST3	10,183 x 10 ⁻⁴	0,117	2757,58
BC-AST5	10,183 x 10 ⁻⁴	0,127	2993,27

Hasil perhitungan LTUR dirangkum dalam Tabel 3, hasil perhitungan menunjukkan membran BC-AST3 dan BC-AST5 memiliki nilai LTUR yang cukup tinggi yaitu 2757,58 dan 2993,27 g/m²/hari, akan tetapi nilai LTUR tersebut mendekati rentang nilai LTUR yang direkomendasikan untuk material pembalut luka yaitu antara 2000-2500 g/m²/hari^(5,12). Tingginya nilai LTUR dari membran BC-AST sesuai dengan hasil pengujian kapasitas absorpsinya, keberadaan gugus karboksilat pada membran BC-AST meningkatkan nilai LTUR karena terjadinya interaksi antara air dengan gugus karboksilat pada BC-

AST melalui ikatan hidrogen.

Aktivitas Antimikroba

Infeksi sekunder pada luka merupakan salah satu masalah serius dalam penanganan dan perawatan luka. Beberapa penelitian melaporkan bahwa kitosan memiliki sifat antimikroba yang cukup baik, pada penelitian ini penambahan kitosan diharapkan dapat memperbaiki sifat antimikroba pada BC. Aktivitas antimikroba membran BC, BC-CH dan BC-AST di uji dengan menggunakan metoda difusi agar. Hasil pengujian menunjukkan membran BC-AST3 dan BC-AST5 memberikan zona

hambat/inhibisi terhadap semua bakteri uji, sedangkan membran BC dan BC-CH tidak memberikan zona hambat terhadap semua bakteri uji (Gambar 2).

Membran BC-CH tidak memberikan zona hambat terhadap semua jenis bakteri, hal ini dikarenakan kitosan terikat secara kuat terhadap BC melalui ikatan hidrogen intermolekular sehingga kitosan tidak dapat berdifusi ke sekeliling medium agar dan menghambat pertumbuhan bakteri, hasil yang sama juga dilaporkan oleh Lin dkk.⁽⁷⁾ Sedangkan, membran BC-AST3 dan BC-AST5 menunjukkan aktifitas antimikroba terhadap semua bakteri yaitu *E. coli*, *S. typhi*, *P.*

aeruginosa dan *S. aureus*. Hal ini dimungkinkan karena adanya sitrat yang terikat pada BC. Pada reaksi antara BC dengan kitosan dengan menggunakan asam sitrat sebagai agen pengikat silang, sitrat berikatan pada BC membentuk ester BC-sitrat⁽⁸⁾. Pada membran BC-AST tersebut terjadi disosiasi gugus asam karboksilat menjadi ion sehingga terjadi penurunan pH yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri^(9,10). Penelitian serupa pada selulosa tekstil yang direaksikan dengan sitrat juga menunjukkan sifat antimikroba yang efektif⁽¹⁰⁾.

Gambar 2. Perbandingan aktivitas antimikroba dari BC, BC-CH, BC-AST3 dan BC-AST5 terhadap (a) *S. Typhi*, (b) *P. Aeruginosa*, (c) *S. Aureus*, (d) *E. Coli*.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa modifikasi selulosa bakteri menggunakan asam sitrat dan kitosan meningkatkan kapasitas absorpsi dan sifat antibakteri membran BC.Membran selulosa bakteri-sitrat-kitosan (BC-AST) memberikan nilai kapasitas absorpsi dalam air demineralisasi (DM) sebesar 21,5 g/g dan kapasitas absorpsi dalam larutan salin (NaCl 0,9%) 8,2 g/g. BC-AST menunjukkan sifat antimikroba yang baik terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Nilai pengujian laju transmisi uap air/LTUR membran BC-AST juga menunjukkan nilai yang mendekati nilai LTUR yang direkomendasikan untuk pembalut luka yaitu 2000-2500 g/m²/hari. Hasil ini mengindikasikan bahwa BC-AST3 dan BC-AST5 sangat berpotensi untuk digunakan sebagai pembalut luka yang bersifat antimikroba.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Dewi Sekar Pangerteni atas diskusi dan bantuannya selama melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. W.K. Czaja, D.J. Young, M. Kaweckj, R.M. Jr Brown. Reviews: The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*. 8: 1-12 (2007)
2. M. Iguchi, S. Yamanaka, A. Budhiono. Bacterial cellulose-a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci*. 35: 261-270 (2000)
3. M. Zaborowska, A. Bodin, H. Bäckdahl, J. Popp, A. Goldstein, P. Gatenholm. Microporous bacterial Cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater*. 6: 2540-2547 (2010)
4. F. Lina, Z. Yue, J. Zhang, Y. Guang. *Biomedical engineering-frontiers and challenges: Bacterial cellulose for skin repair materials*. R. Fazel, editor. InTech Publisher, Croatia, 2011, pp 249-274.
5. B. Balakrishnan, M. Mohanty, P.R. Umashankar, A. Jayakrishnan. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*. 26: 6335-6342 (2005).
6. X.Z. Shu, K.J. Zhu, W. Song. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *Int. J. Pharm*. 212: 19-28 (2001)
7. W.C. Lin, C.C. Lien, H.J. Yeh, C.M. Yu, S. Hsu. Bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydr. Polym*. 94: 603- 611 (2013)
8. A. Salam, J.J. Pawlak, R.A. Venditti, K. El-tahlawy. Synthesis and characterization of starch citrate-chitosan foam with superior water and saline absorbance properties. *Biomacromolecules*. 11:1453-1459 (2010)
9. R.K. Pundir, P. Jain. Evaluation of five chemical food preservatives for their antibacterial activity against bacterial isolates from bakery products and mango pickles. *J. Chem. Pharm. Res*. 3:24-31 (2011)
10. B.S. Vukušić, F.S. Grgac, A. Budimir, S. Kalenić. Cotton textiles modified with citric acid as efficient antibacterial agent for prevention of

- nosocomial infections, *Croat. Med. J.* 52: 68–75 (2011)
11. D. Darwis. Effect of gamma irradiation on microbial cellulose membrane for application in guided bone regeneration (GBR). *J. Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*.5: 83-102 (2009)
 12. D. Queen, J.D.S. Gaylor, J.H. Evans, J.M. Courtney. The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings. *Biomaterials*. 8: 367-371. (1987)
 13. M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, J., **Biology of microorganisms**, 8th ed. Prentice Hall International, NewJersey, 1997, pp 406-408.
 14. Indriyati, R. Yudianti, M. Karina. Development of nanocomposites from bacterial cellulose and poly(vinyl alcohol) using casting-drying methods. *Procedia Chemistry*. 4: 73-79 (2012)